

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI SCIENZE
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE
IMMUNOLOGICA DI UN ALLERGENE DEL
POLLINE DI *PARIENTARIA JUDAICA***

Walter Arancio 2011 copyright
All rights reserved- Tutti i diritti sono riservati
ISBN 978-1-4457-9586-7

Tratto da:
Tesi di laurea di Walter Arancio
Relatore: Professore Giovanni Giudice
Correlatore: Dottore Paolo Colombo
Anno accademico 2001-2002

INDICE

La <i>Parietaria judaica</i>	5
La pianta nel mondo	5
Il polline ed il rapporto coll'uomo	5
Storia e sistematica della pianta	6
Il sistema immunitario umano: caratteristiche generali	9
Relazioni ambiente-organismo	9
I tipi di risposta del sistema immunitario	9
Le cellule del sistema immunitario	10
Molecole della risposta umorale	11
Autoimmunità ed allergia	13
Il sistema immunitario umano: la risposta adattativa	15
I linfociti B attraverso i vari stadi di maturazione	15
I linfociti T attraverso i vari stadi di maturazione	19
Fenotipi Th0, Th1 e Th2	20
Interazioni tra i linfociti B ed i linfociti T	21
Note	22
Il sistema immunitario umano: il fenomeno delle allergie	26
I quattro tipi di ipersensibilità	26
Meccanismi di base	30
Le cellule T	32
I linfociti B	35
I mastociti	37
I basofili	38
Gli eosinofili e la risposta tardiva	38
I macrofagi	39
Il tessuto polmonare	40
Note	40
Premesse al lavoro	42
Analisi dell'estratto crudo di polline di <i>Parietaria judaica</i>	42
Materiali e metodi	46
Analisi di una libreria di espressione in λ ZAPII con sieri di pazienti allergici	46
Marcatura radioattiva di un frammento di DNA con inneschi casuali	47
Analisi di cloni col metodo Southern	47
Sequenziamento di un clone di DNA	48
Protocollo 3' RACE e 5' RACE	48
Elettroeluizione di un frammento di DNA da gel di agarosio	51
Digestione di DNA con enzimi di restrizione	51
Ligasi di un DNA amplificato di DNA in Bluescript KS con coda di T	52
Creazione di stab di <i>E. coli</i> M15 competenti alla trasformazione	52

Trasformazione di <i>E. coli</i> M15 ed XL1 Blue competenti con plasmide circolare covalentemente chiuso	54
Trasferimento di un frammento di DNA da Bluescript KS con coda di T al vettore di espressione pQE30	54
Induzione di cloni di <i>E. coli</i> M15 trasformati con pQE30 contenente un inserto da esprimere	55
Purificazione della proteina indotta	56
Hys-probe	57
Analisi della proteina indotta tramite dot blot	58
Risultati	59
Isolamento e sequenziamento	59
RACE	60
Clonaggio del frammento all'interno del vettore di espressione	61
Espressione, purificazione e caratterizzazione immunologica della proteina ricombinante	62
Discussione	63
Metodologie terapeutiche	63
ITS	64
Vantaggi nell'uso di allergeni ricombinanti	67
Bibliografia	72

LA *PARIETARIA JUDAICA*

La pianta nel mondo.

La *Parietaria judaica* è una pianta appartenente alla famiglia delle Urticacee che risulta ampiamente diffusa nel territorio siciliano, ma la cui presenza si rivela essere cospicua in tutto il territorio italiano temperato. Considerando le altre specie di *Parietaria*, sono circa una trentina, la diffusione di questo genere di pianta risulta essere estremamente vasta; si possono trovare esemplari quasi in qualunque zona temperata o tropicale del vecchio e del nuovo mondo, anche se l'area del Mediterraneo è il luogo d'elezione per la crescita in particolare della specie *judaica* ed *officinalis*; considerando che si è riscontrata una certa costanza nelle proteine del granulo pollinico attraverso le varie specie (soprattutto tra *judaica* ed *officinalis*), e che è questi il veicolo in grado di scatenare la risposta allergica, credo di potere affermare che una analisi più approfondita di questa pianta, in un mondo nel quale il problema delle allergie sta divenendo sempre più diffuso e di gravità sempre crescente, non sia una operazione futile. Per capire la potenziale pericolosità della *Parietaria*, basti considerare che circa la metà delle allergie registrate in Sicilia in ambito clinico siano da attribuirsi a questa pianta. Un conto sommario porta ad ipotizzare che almeno dieci milioni di individui nel mondo siano allergici alla *Parietaria judaica*; sebbene spesso le reazioni siano limitate a congiuntiviti e riniti di gravità variabile, che incidono negativamente sulla qualità della vita in modo più o meno profondo secondo il soggetto e secondo la potenza della risposta allergica, talvolta il polline è in grado di scatenare crisi di asma che teoricamente potrebbero anche portare a morte.

Il polline ed il rapporto coll'uomo.

Il polline della *Parietaria* è di piccole dimensioni ed in tal modo può essere facilmente trasportato sia dal vento che da corpi e può facilmente entrare nelle vie aeree umane, dove l'ambiente umido permette l'apertura del granulo pollinico ed il contatto con le mucose degli eventuali allergeni non presenti sulla superficie esterna del granulo; inoltre il granulo pollinico presenta delle protuberanze a forma di spina su tutta la superficie, ricoperta anche di peli radi ed asperità silicee in grado di irritare le mucose e quindi di richiamare i globuli bianchi ed altri fagociti in situ, aumentando la gravità della risposta allergica che è mediata appunto da componenti delle cellule del gruppo dei leucociti

che danno una risposta anomala, come tratterò più nel dettaglio nella continuazione della tesi.

Ad aumentare la potenziale pericolosità della *Parietaria* contribuisce il periodo di pollinazione che, sebbene nelle zone più fredde vada da maggio a settembre, nelle regioni più temperate si estende da marzo ad ottobre, potendo provocare reazioni acute per otto mesi su dodici, con un picco nel periodo di inizio estate. Con l'innalzamento della temperatura e la deregolazione dei cicli stagionali che stiamo vivendo (anno 2002) si può purtroppo ipotizzare che questo già ampio periodo possa estendersi ancora, anche se questo male impallidisce al confronto di ciò che potrebbe succedere al mondo intero se i cicli naturali continueranno ad alterarsi per movimenti non interni al mondo stesso, ma condizionati da noi uomini sconsiderati e matricidi.

La *Parietaria judaica*, grazie agli stami che, con un meccanismo a scatto, lanciano nell'aria una nuvoletta di polline all'apertura della corolla, ha evoluto un sistema che le permette di diffondere il polline in assenza di vento, ma che in presenza di questo è in grado di distribuirsi su vasti territori, vista anche la copiosità colla quale la pianta produce il polline stesso. Come dice lo stesso nome, la *Parietaria* cresce molto bene su muri, crepe di questi, casolari diroccati od ambientazioni simili, trovandosi spesso a condividere le stesse zone con noi umani, anche se è in grado di diffondersi ampiamente e colonizzare vasti territori, tanto che la sua presenza in zone rurali è altrettanto cospicua.

Storia e sistematica della pianta.

Da un punto di vista sistematico e morfologico, la *Parietaria Judaica* è una pianta erbacea perenne delle angiosperme dicotiledoni in grado di raggiungere gli ottanta centimetri d'altezza, con foglie intere, opposte, di colore verde intenso che si dipartono da un fusto legnoso; i fiori sono piccoli, generalmente unisessuati, riuniti in infiorescenze glomerulari alla ascella delle foglie; sebbene faccia parte delle Urticacee non usa il silicio per creare spine urticanti sul fusto e sulle foglie come altre piante della stessa famiglia, ma come accennato se ne ritrovano resti sul granulo pollinico.

Nella tradizione popolare la *Parietaria* viene definita comunemente "muraiola", a conferma delle sue abitudini nella scelta dell' habitat. La specie *Parietaria officinalis* è conosciuta ed usata sin dall'antichità come fitoterapico con proprietà depurative, diuretiche, emollienti e rinfrescanti [1].



Immagini di Parietaria nella città di Palermo.



Immagini di Parietaria nella città di Palermo.

IL SISTEMA IMMUNITARIO UMANO: caratteristiche generali

Relazioni ambiente-organismo.

Noi esseri umani viviamo in un ambiente colmo di potenziali organismi patogeni, quali batteri, funghi, virus, protozoi od anche organismi pluricellulari, ed abbiamo evoluto una serie di meccanismi che ci permettono di sopravvivere in questo ambiente ostile sia impedendo l'interazione tra questi organismi con le parti suscettibili all'infezione del nostro corpo, sia evolvendo meccanismi che ci permettono di superare l'avvenuta infezione e di "ricordare" il patogeno che ha superato le nostre prime linee di difesa, in modo tale che, se dovesse avvenire nuovamente una infezione causata dallo stesso agente, saremmo in grado di rispondere efficacemente a questa minaccia che già in precedenza era riuscita almeno una volta a superare le nostre difese. In primis, siamo rivestiti dalla pelle cheratinizzata, e sono pochissimi i patogeni in grado di superare questa barriera impermeabile se rimane intatta, ad esempio il virus dell'epatite B necessita di entrare direttamente in contatto col sangue dell'eventuale neo ospite per potere cercare di infettarlo; per questo motivo la maggior parte dei patogeni cerca di entrare nel nostro organismo attraverso le cavità umide, quali il tratto gastrointestinale, le cavità aeree o l'apparato urogenitale; in queste sedi le nostre difese risiedono in organismi simbiotici che competono con gli eventuali patogeni per il microambiente, oltre a difese chimiche quali il basso pH dello stomaco o delle basse vie dell'apparato urogenitale, od i sali biliari nel tratto intestinale in grado di uccidere i batteri Gram+, od ancora il lisozima e le IgA (di cui scriverò dopo) presente nelle lacrime ed in altre secrezioni. Cellule del sistema immunitario si ritrovano già attive in queste sedi più interne del nostro corpo, ma la loro funzione risulta essenziale nel caso che i patogeni siano già riusciti a penetrare nelle trame dell'organismo, dove le cellule del nostro sistema immunitario riescono ad individuare ed eventualmente ad eliminare tanto i virus che si replicano all'interno delle cellule, quanto i batteri che possono replicarsi nei compartimenti più differenti; ciò per scrivere di un esempio che evidenzia l'ecletticità che deve possedere la nostra risposta ai patogeni per garantirci la sopravvivenza [2].

I tipi di risposta del sistema immunitario.

La nostra risposta immunitaria si basa su due grossi meccanismi: una risposta innata mediata dai fagociti, quali monociti, macrofagi e

neutrofili polimorfonucleati, che riconoscono microrganismi, li internalizzano e li uccidono. Questo tipo di risposta è primitiva, non particolarmente efficiente ed aspecifica, ma rappresenta la nostra prima linea di difesa contro potenziali patogeni penetrati nel nostro organismo. Il secondo tipo di risposta viene definita adattativa, ed è mediata principalmente dai linfociti T e B, in grado di cooperare tra loro e coi fagociti per concertare una risposta altamente specifica mediante contatti cellula-cellula e rilascio di sostanze diffusibili, risposta molto efficiente, lenta ad instaurarsi al primo contatto con un nuovo patogeno, ma veloce ed esplosiva se l'organismo rientra in contatto collo stesso patogeno una seconda volta. Tradizionalmente le risposte operate da cellule vengono definite cellulari; quelle mediate da sostanze diffusibili, quali gli anticorpi ad esempio, vengono invece definite risposte umorali. Come analizzerò in seguito, in realtà questi non sono due compartimenti distinti, anzi v'è un concerto tra queste due modalità di risposta, tanto che l'una senza l'altra vedrebbe venir meno la propria efficacia nel difendere l'organismo dai patogeni [2].

Le cellule del sistema immunitario.

Molte sono le cellule del sistema immunitario, ed ogni categoria svolge specifiche funzioni, che permettono nel loro insieme di dare una efficiente risposta coordinata alla tentata invasione da parte di organismi estranei.

I **fagociti** sono cellule derivate dal tessuto emopoietico del midollo osseo, la loro funzione principale è quella di internalizzare particelle estranee, compresi microrganismi, e distruggerle, per questo scopo la loro disposizione è strategica; ad esempio prendono il nome di **cellule del Kupfer** quelle che stazionano nel fegato a livello dei sinusoidi dove scorre il sangue da depurare; si chiamano cellule **sinoviali A** quelle che stazionano nella cavità sinoviale; si chiamano **monociti** quelli circolanti nel sangue, che divengono **magrofagi** quando migrano nei tessuti circostanti; quest'ultima categoria risulta importante ad esempio nell'interazione coi linfociti T, sebbene siano meno importanti delle **cellule dendritiche** delle mucose o delle **cellule del Langerhans** del derma, come scriverò in seguito. Un' ultima categoria di fagociti sono i **neutrofili polimorfonucleati**, presenti in gran numero nel sangue e capaci di migrare all'interno dei tessuti ma caratterizzati da una vita breve e dal suicidio per apoptosi come conseguenza della distruzione del materiale internalizzato.

Tutti i linfociti derivano dal tessuto emopoietico del midollo osseo, ma i linfociti T maturano nel timo, i linfociti B nel midollo osseo stesso (T da thymus, timo; B da bone-marrow, midollo osseo; secondo alcuni autori da Borsa di Fabrizio).

I **linfociti B** sono geneticamente programmati per codificare un recettore di superficie specifico per un particolare antigene; una volta riconosciuto questi, i linfociti B divengono plasmacellule e secernono una forma solubile del recettore detto anticorpo; visto che l'anticorpo è praticamente identico al recettore iniziale, questo riconosce l'antigene che inizialmente aveva attivato la cellula B.

I **linfociti T** si dividono in una serie di categorie con funzioni differenti; **Th (T helper, aiutanti)**, che interagiscono colle cellule B modulando profondamente la loro risposta, o coi monociti potenziando la loro attività nel distruggere patogeni intracellulari; **Tc (T citotossici)** che direttamente distruggono cellule interagendo con il recettore MHCI (major histocompatibility complex 1, complesso di istocompatibilità maggiore 1) tramite il loro recettore TCR (T cell receptor, recettore delle cellule T), rilasciando monomeri di perforina che polimerizzando nella membrana della cellula bersaglio infetta e ne provocano la morte per sconvolgimento osmotico. I recettori MHC vengono definiti nella specie umana HLA (antigene leucocitario umano).

Un tipo particolare di cellule del sistema immunitario sono definite **NK (natural killer, assassini naturali)**, in grado di uccidere cellule anche mancanti di MHCI, come alcune cellule tumorali, che hanno perso la capacità di sintetizzare ed esporre questa proteina di membrana in seguito all'instaurarsi del fenotipo neoplastico.

Oltre ai neutrofili sono presenti altre due categorie di granulociti, cellule che presentano granuli di sostanze nel citoplasma ancorati ai microtubuli e pronti a rilasciarne il contenuto in seguito ad appropriati stimoli esterni: gli **eosinofili** che in risposte non anomale rilasciano sostanze per uccidere parassiti extracellulari come gli elminti, ed i **mastociti** che rilasciano sostanze che mediano infiammazione nei tessuti circostanti e la qualità della risposta delle altre cellule del sistema immunitario copresenti nel sito dell'attivazione delle cellule, i basofili sono mastociti che rimangono esclusivamente circolanti e generalmente non migrano nei tessuti [2].

Molecole della risposta umorale.

Oltre alle cellule vi sono una serie di sostanze presenti nel plasma sanguigno che mediano o modulano la risposta immunitaria.

Le proteine del complemento svolgono una serie di funzioni distinte, quali la capacità di rivestire direttamente organismi patogeni (detta opsonizzazione) e di permetterne l'internalizzazione nei fagociti e la loro degradazione; l'attrazione dei fagociti per chemiotassi nei luoghi di infezione, aumentando anche la permeabilità dei capillari ed il flusso sanguigno in situ; capacità di danneggiare le membrane di cellule infettanti, batteri Gram-, rivestimenti membranosi di particelle virali e causarne l'eventuale lisi; far rilasciare mediatori infiammatori dai mastociti.

Un ruolo importantissimo nella modulazione della risposta immunitaria è svolta dalle citochine, proteine, peptidi o glicoproteine, che permettono la comunicazione chimica tra le cellule durante la risposta ai patogeni. Spesso le citochine prodotte dai linfociti vengono definite linfochine. Le molecole di interferone svolgono un ruolo principe nella resistenza all'infezione virale, proteggendo le cellule non infettate da una possibile infezione da parte del virus stesso; l'interferone α e l'interferone β sono prodotti direttamente dalle cellule infettate, mentre l'interferone γ è prodotto dai linfociti T in particolari condizioni. Vi è un gruppo di citochine definite interleuchine, sono diciassette molecole, prodotte quasi esclusivamente dalle cellule T, anche se alcuni fagociti ed alcune cellule somatiche di altro tipo ne producono alcune; la maggior parte delle interleuchine dirigono le altre cellule a dividersi ed a differenziarsi, modulando profondamente la risposta immunitaria. Ognuna di queste molecole interagisce con un ristretto gruppo di cellule che esprime lo specifico recettore. Vi sono inoltre una serie di sostanze che modulano e dirigono la divisione e la differenziazione delle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo, oltre ad una serie di citochine come il $\text{TNF}\alpha$ (tumour necrosis factor α , fattore di necrosi tumorale α) od il $\text{TNF}\beta$ (tumour necrosis factor β) ed il $\text{TGF}\beta$ (transforming growth factor β , fattore di crescita trasformante β) che svolgono molte funzioni, tra le quali sono da ricordare il loro ruolo nel mediare infiammazioni e reazioni citotossiche. Di interesse per lo studio il GM-CSF (fattore che stimola la formazione di granulociti e macrofagi), per le sue proprietà chemiotattiche.

Probabilmente la classe di glicoproteine solubili che più direttamente va ad interagire con i potenziali organismi patogeni è quella delle immunoglobuline (Ig) secrete dalle cellule B, specificatamente indotte da una sostanza esterna verso la quale sono altamente specifiche tramite la loro regione variabile, ed in grado di scatenare una serie di reazioni a

valle tramite la loro regione costante. Le sostanze in grado di scatenare la produzione di Ig sono dette antigeni, possono essere di natura altamente mutevole, anche se spesso sono proteine o glicoproteine della superficie degli organismi patogeni che così possono venire riconosciuti dall'organismo ed eliminati in quanto marcati come nocivi [2].

Autoimmunità ed allergia.

Alterazioni nel funzionamento del concerto della risposta immunitaria portano a patologie quali l'autoimmunità, dove proteine proprie vengono riconosciute come estranee e che porta alla perdita del funzionamento generalmente di uno o più organi che vengono "eliminati" ed ad altre modificazioni che portano alle sintomatologie più varie, come la miastenia gravis, dove una delle possibili cause è l'iperattivazione dei recettori colinergici sulle cellule muscolari da parte degli anticorpi che porta ad una sottoproduzione (detta down-regulation) del recettore stesso ed ad una progressiva incapacità di stimolare il muscolo, portando alla perdita dell'uso della muscolatura; oppure alterazioni dell'azione del sistema immunitario portano al fenomeno dell'allergia, dove l'iperattivazione di meccanismi infiammatori porta a sintomatologie molto variabili in risposta ad antigeni (detti in questo caso allergeni) che normalmente provocano una normale risposta immunitaria senza effetti macroscopici; talvolta le crisi allergiche portano ad una patologia così pesante che può portare addirittura a morte per sconvolgimento anafilattico dell'organismo od a morte per asfissia [2].



Anafilassi da veleno d'ape.



Allergia al riso.

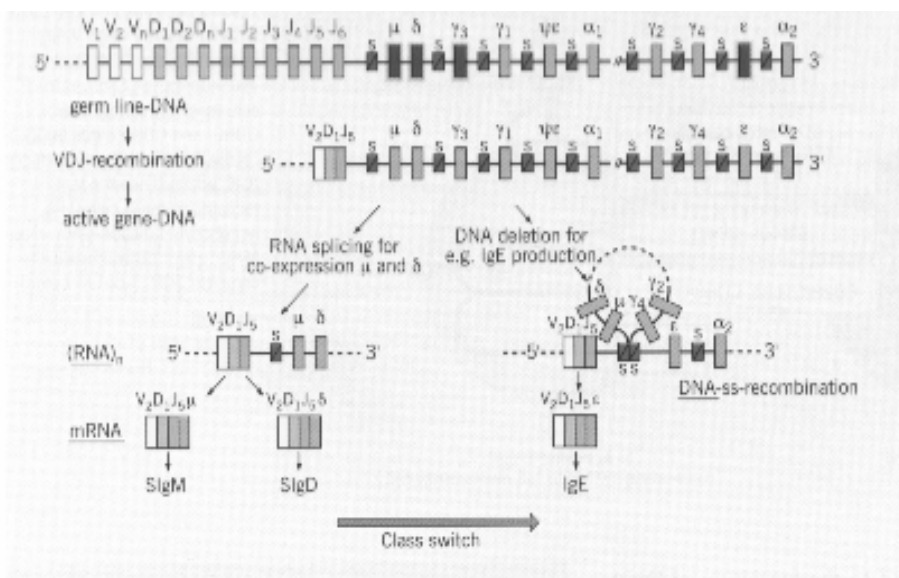
IL SISTEMA IMMUNITARIO UMANO: la risposta adattativa

La risposta immunitaria mediata da cellule B e cellule T ha il suo punto di forza nella eterogeneità colla quale vengono riconosciute sostanze estranee all'organismo, questo prodigio è realizzato durante l'emopoiesi grazie a riarrangiamenti del materiale genetico che codifica i recettori di superficie deputati al riconoscimento delle molecole estranee; ricordo che gli anticorpi secreti dalle cellule B null'altro sono se non prodotti di splicing alternativo degli stessi geni che codificano per il recettore, anticorpi che mantengono la stessa specificità del recettore per l'antigene, ma che hanno perso i segnali di ancoraggio alla membrana [2].

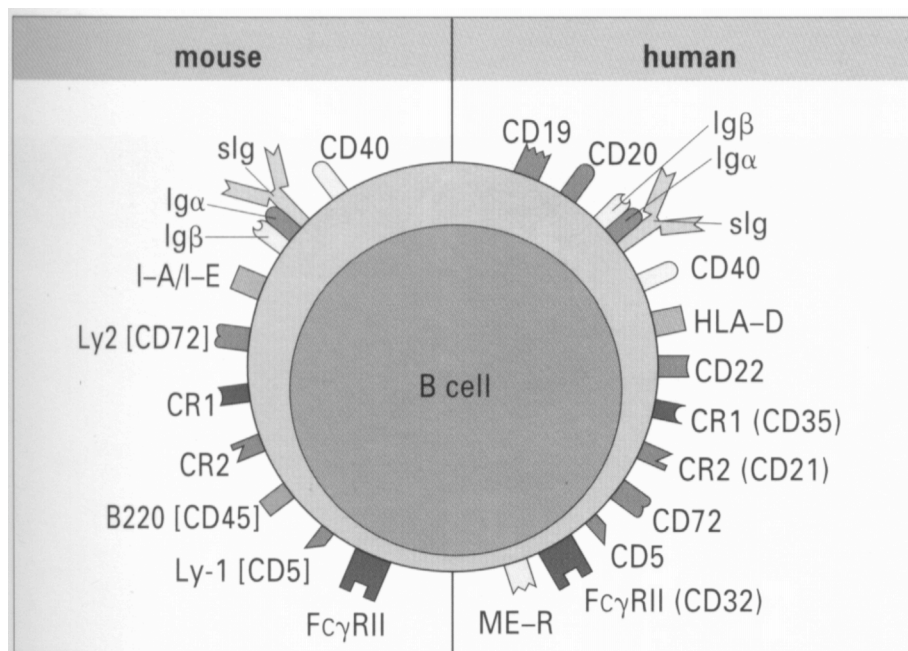
I linfociti B attraverso i vari stadi di maturazione.

Le immunoglobuline delle cellule B sono formate da due catene pesanti e due catene leggere, ogni catena è formata da una parte variabile e da una costante, organizzate in modo tale che le parti variabili siano spazialmente vicine. E' appunto questa regione la responsabile del riconoscimento differenziale degli antigeni; questa diversità è ottenuta, per le catene leggere, a livello del DNA delle cellule, dalla ricombinazione somatica di uno dei tanti segmenti V con uno dei pochi segmenti J, per la formazione della parte variabile, e con il segmento κ o λ per la regione costante; per le catene pesanti dalla ricombinazione somatica di uno dei segmenti V con uno dei trenta segmenti D con uno dei segmenti J per la porzione variabile, e con una porzione costante regolata differentemente attraverso il tempo. In cellule B non attivate la regione costante delle catene pesanti viene unita definitivamente a livello di RNA per splicing alternativo, in quanto nella linea somatica sono presenti ancora i geni che codificano per le dieci regioni costanti, nell'ordine, μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\psi\epsilon$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, ϵ ed $\alpha 2$, che portano alla formazione delle varie classi di immunoglobuline. Generalmente cellule B non attivate presentano ancorate sulla loro superficie IgM ed IgD (con la loro regione costante delle catene pesanti rispettivamente μ e δ), dopo una prima stimolazione con antigene iniziano a secernere IgM, dopo una seconda stimolazione con l'aiuto delle citochine e dell'interazione fisica colle cellule T possono andare incontro a cambiamenti isotipici della classe di Ig, gestito a monte da riarrangiamenti somatici del DNA, ciò perchè a monte di ciascuno dei geni che codificano per la regione costante delle catene pesanti, ad eccezione del semento δ , è presente una sequenza che può ricombinare

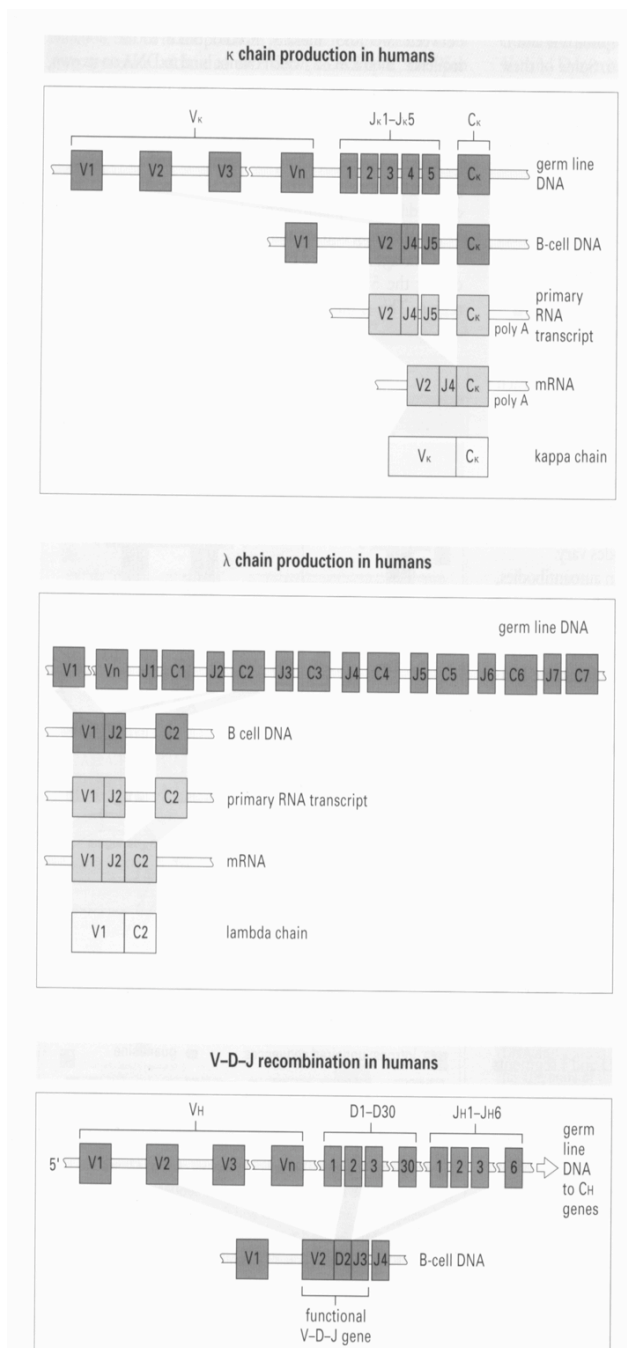
e portare all'escissione del segmento di DNA frapposto. Se ricombina il segmento pre- μ con il segmento pre- ϵ tutta la regione frapposta tra queste due regioni verrà persa e le immunoglobuline prodotte saranno quelle contenenti la parte costante della catena pesante ϵ , ovvero IgE; questo cambiamento isotipico in tal modo risulta irreversibile. Da notare che dopo interazione colle cellule T, si è visto un aumentato tasso di piccole mutazioni a carico delle regioni variabili, probabilmente finalizzato ad aumentare la variabilità in regioni che già hanno riconosciuto un antigene, per cercare di ottenere qualche clone che abbia, grazie a queste mutazioni, ottimizzato la risposta nei confronti dell'antigene stesso [2].



Riassortimento genetico e posttrascrizionale della porzione variabile delle immunoglobuline - Tratto da [2].



Marker si superficie dei linfociti B nel topo e nell'uomo - Tratto da [2].



Riassortimento genetico nelle catene delle immunoglobuline nei linfociti B - Tratto da [2].

I linfociti T attraverso i vari stadi di maturazione.

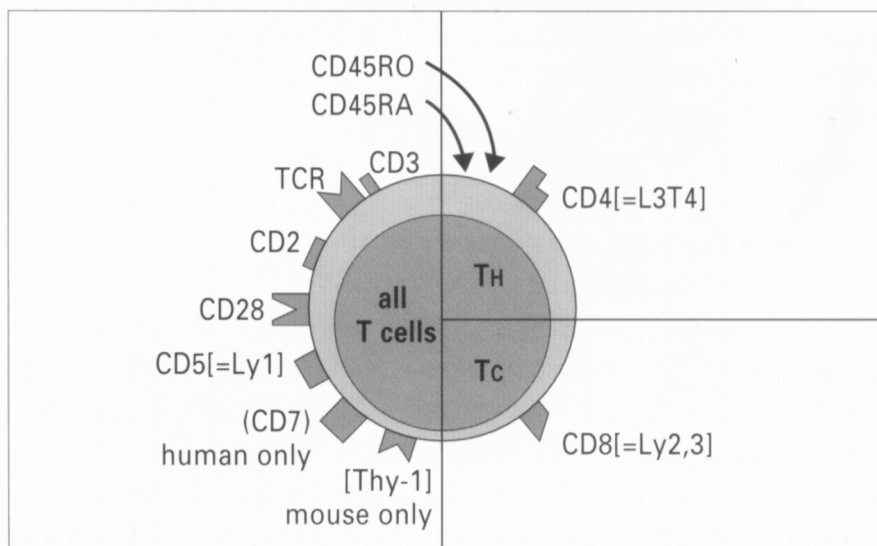
Per quanto concerne il recettore delle cellule T, detto TCR (T cell receptor), questi è composto da due regioni variabili dette “ α e β ” e “ γ e δ ”, rispettivamente espresse nelle cellule T periferiche e prevalentemente in quelle timiche; questo recettore presenta fenomeni di variabilità somatica estremamente simili a quello delle cellule B, sebbene non riesca a raggiungere l'estremo vasto spettro di molecole riconosciute posseduto dai linfociti B; il TCR risulta completo quando diviene associato col tetramero recettoriale CD3, tra l'altro marcatore specifico dei linfociti T. Da notare che a differenza delle Ig dei linfociti B, il TCR è in grado di riconoscere solo epitopi (parti riconoscibili dell'antigene da parte dei recettori) lineari, non tridimensionali, e per questo necessita che altre cellule degradino parzialmente gli antigeni e che li esponano loro tagliati in frammenti piccoli.

La maturazione dei linfociti T non termina con il riarrangiamento genetico avvenuto durante l'emopoiesi, bensì esse sono indirizzate verso il timo dove avvengono una serie di modificazioni e selezioni che permetteranno loro di svolgere appieno le loro funzioni senza arrecare nocimento all'organismo; il primo di questi passaggi è detto selezione timica, ovvero vengono eliminate tutte le cellule in grado di riconoscere molecole dell'individuo. Quasi tutti i problemi di autoimmunità avvengono per una inefficiente selezione timica. Nel timo luogo i linfociti T iniziano a presentare due distinti marcatori di superficie detti CD8 e CD4. Le cellule CD8⁺ sono cellule T citotossiche che riconoscono tramite il loro TCR il MHCI presente su tutte le cellule dell'organismo, MHCI che presenta peptidi propri della cellula sulla cui superficie si trova. Cellule Tc che abbiano ricevuto un'appropriata selezione timica non riconoscono nessuna cellula dell'organismo, ma portano a morte tutte le cellule estranee (il rigetto d'organi è dovuto alla loro azione) e tutte le cellule che presentano nel loro MHCI peptidi non propri, come può avvenire dopo infezione da batteri, virus o protozoi con ciclo di replicazione intracellulare.

Le cellule CD4⁺ invece riconoscono specificatamente il MHCII, molecola di membrana portata da cellule specializzate nella fagocitosi di elementi estranei, che dopo parziale digestione espongono su questo complesso proteico i frammenti digeriti e sono in grado di attivare le cellule T CD4⁺, che sono appunto cellule Th in grado di iniziare in tal modo la risposta immunitaria adattativa.

Dopo la maturazione nel timo le cellule T migrano verso le zone T dei linfonodi dove possono incontrare le cellule dette APC (cellule che presentano l'antigene); ancora prima della loro attivazione le cellule T iniziano a produrre interleuchina 2, potente agente proliferativo nei confronti delle stesse cellule T.

Tutte le cellule che presentano attività fagocitaria possono essere APC, però le cellule dendritiche e quelle del Langerhans risultano essere le più efficienti. Quando queste cellule incontrano un potenziale antigene e lo fagocitano vengono attratte verso le zone T del linfonodo, dove si trovano i linfociti T, grazie alla chemiotassi mediata principalmente da GM-CSF, in questa zona sovraesprimono il MHCII esponendo il peptide esogeno ed attivando le cellule Th in grado di riconoscerlo tramite il TCR [2].



Marker di superficie dei linfociti T nel topo e nell'uomo - Tratto da [2].

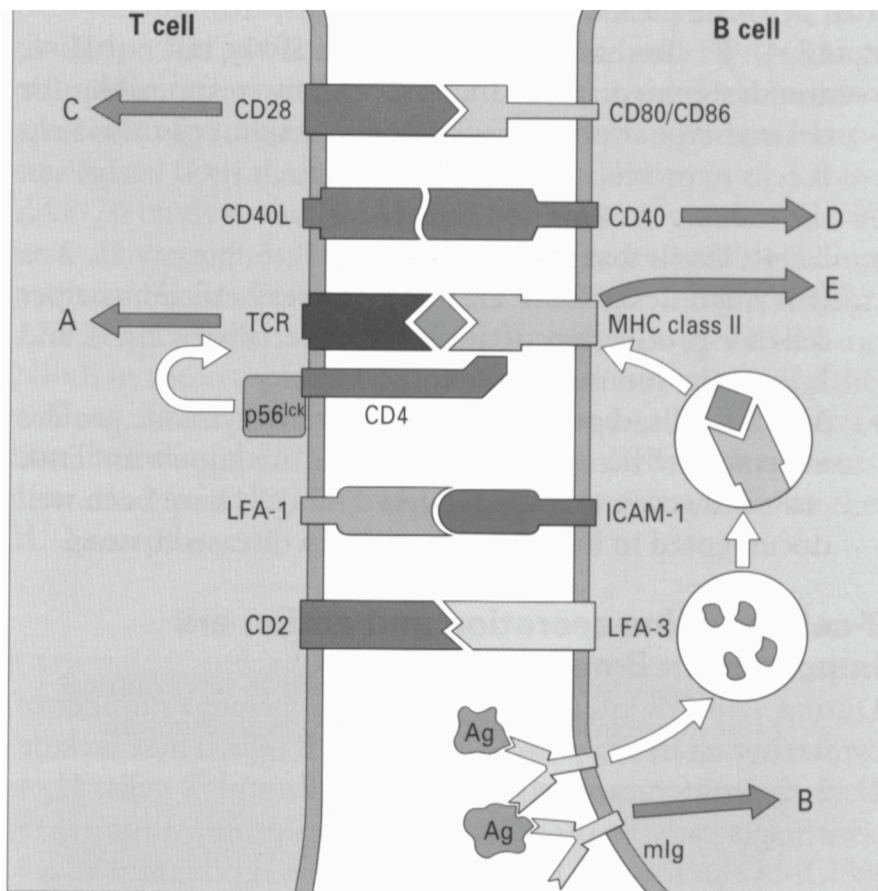
Fenotipi Th0, Th1 e Th2: le citochine che li caratterizzano ed i loro effetti.

Nelle zone T del linfonodo le cellule Th attivate dalle APC divengono cellule Th0 che producono oltre all' interleuchina 2, una vasta gamma di altre citochine quali interleuchina 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, interferone γ , TNF α , GM-CSF. Molte di queste citochine svolgono effetti trofici sulle stesse APC che le hanno attivate. Le cellule Th0 successivamente in base al contesto a cui è avvenuta la loro attivazione si differenziano in cellule effettrici e cellule memoria, ed in base allo spettro di

citochine che da questo momento in poi produrranno verranno definite Th1 e Th2; le prime rilasciano interferone γ , TNF β , interleuchina 3 e 12; questa gamma di citochine stimola attività citotossiche cellulo-mediate e produzione di IgG; le seconde secernono TNF α , GM-CSF; interleuchina 4, 5, 6, 9, 10, 13. Questo spettro di citochine invece stimola secrezione di anticorpi da parte delle cellule B, soprattutto di IgE, importanti mediatori della reazione allergica, il cui obiettivo originale erano parassiti pluricellulari (come gli elminti intestinali). L'interleuchina 5 è indispensabile per la maturazione ed il reclutamento degli eosinofili, importanti cellule mediatrici della risposta allergica tardiva. Da notare che nell'uomo i due spettri non sono mutuamente esclusivi, al contrario ad esempio del topo, anche se vi è una rete di comunicazione mediata dalle citochine stesse che porta una popolazione di cellule a focalizzarsi preferenzialmente verso il fenotipo Th1 o verso il Th2; l'interferone γ prodotto dalle cellule Th1 inibisce fortemente la proliferazione dei linfociti Th2, l'interleuchina 10 prodotta da quest'ultimi invece inibisce la produzione di interferone γ . Cellule T effettrici così attivate migrano verso le zone B del linfonodo dove possono andare ad incontrare i linfociti B ed andare a modulare la loro attivazione [3] [4].

Interazioni tra i linfociti B ed i linfociti T.

I linfociti B sono in grado di funzionare da APC, solo che risultano poco efficienti; se un linfocita B ha internalizzato e processato un antigene riconosciuto tramite il BCR (B cell receptor, recettore delle cellule B, praticamente le Ig ancorate alla membrana) e lo presenta a cellule T non ancora attivate da APC più efficienti, questa interazione non porta a nulla; se invece l'interazione avviene con una cellula T già attivata in precedenza, cioè già venuta in contatto con peptidi processati da APC efficienti, avviene una reciproca attivazione delle cellule; il linfocita B, modulato dalle citochine rilasciate dal linfocita T, è eventualmente portato a replicarsi, ad avere cambiamento isotipico, a rilasciare anticorpi, a differenziarsi in plasmacellula e cellula memoria, ed eventualmente a subire modificazioni somatiche lievi sulle catene variabili e tutto lo spettro di modificazioni indotte dalle citochine rilasciate dal linfocita T. Quest'ultimo risulta attivato dalla stimolazione del suo TCR che lo porta ancora una volta a dividersi in cellule effettrici e cellule memoria ed ad aumentare la risposta da esso mediata [2].

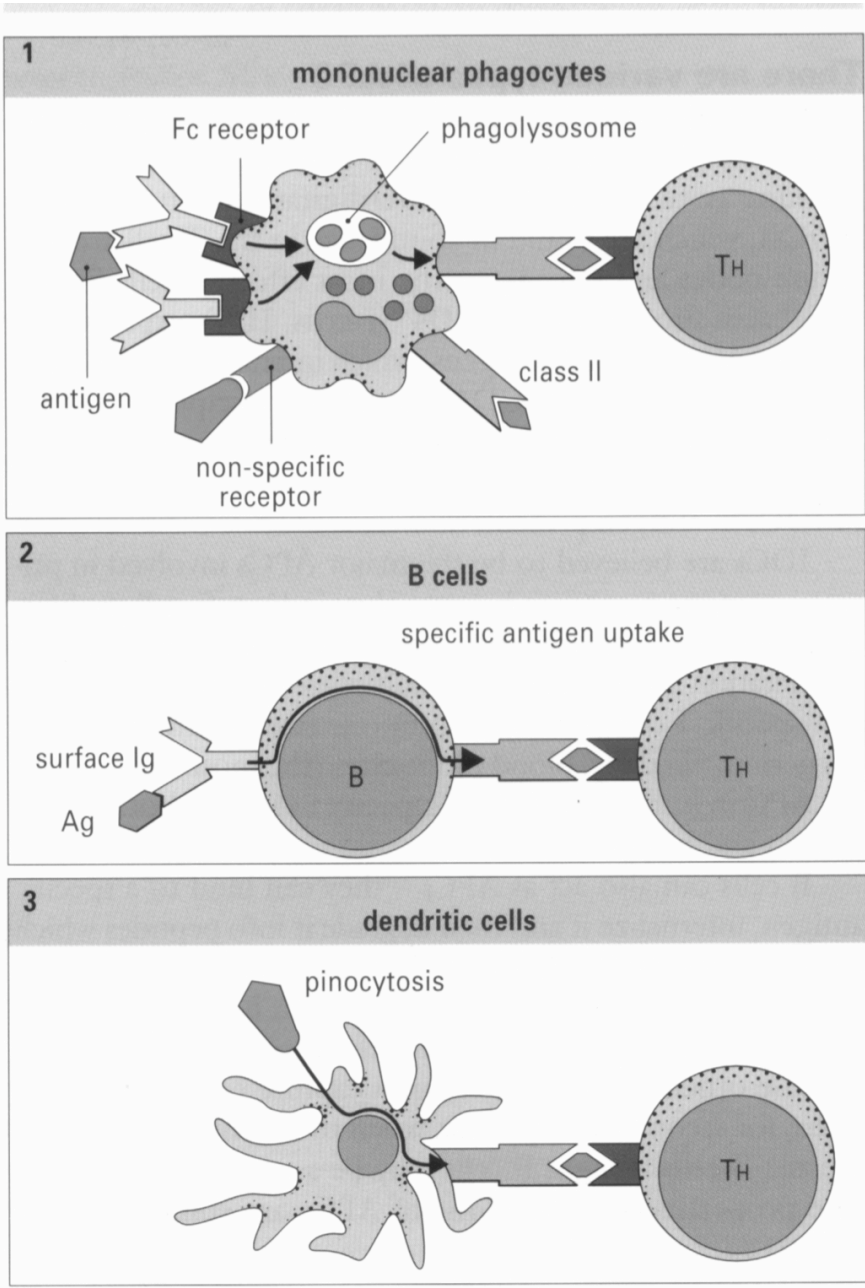


Molecole di superficie coinvolte nell'interazione tra linfociti B e linfociti T- Tratto da [2].

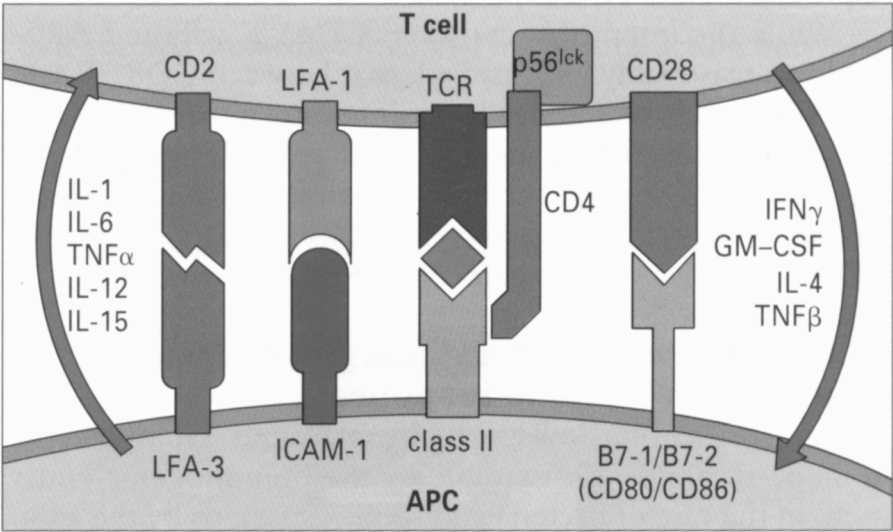
Note.

Note da marcare: la prima è l'espansione monoclonale dei linfociti, ovvero linfociti attivati da un antigene creano un numero notevole di cloni delle singole cellule che hanno risposto in modo più efficiente all'antigene stesso, arricchendo molto la popolazione linfocitaria delle cellule che in quel contesto temporale necessitano. La seconda è il rimodellamento della membrana plasmatica operato dalle APC e dai linfociti B e T, che nei loro contatti cellula-cellula riorganizzano la topologia della membrana per avvicinare spazialmente i recettori, e quindi rimodellando il citoplasma esasperando l'asimmetria cellulare, a conferma che i microdomini di membrana svolgono un ruolo principe nella modulazione delle più variabili risposte biologiche.


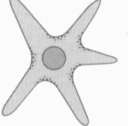

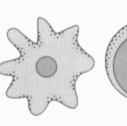
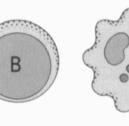

I linfociti T effettori non permangono a lungo nelle zone B del linfonodo, e migrano nel corpo in cerca di altre zone di infezione (mancano dei recettori per poter tornare negli organi linfoidei), dove in caso di tale evento mediano in situ la risposta immunitaria. Una volta non più stimulate le cellule effettrici sia le B (le plasmacellule che secernono quantitativi notevolissimi di anticorpi, dal punto di vista citologico il loro citoplasma è quasi interamente riempito di reticolo endoplasmatico rugoso per la sintesi appunto di anticorpi) sia le T degenerano e muoiono per apoptosi. Le cellule memoria rimangono nell'organismo pronte ed in attesa di scatenare una risposta efficiente ed esplosiva al ripresentarsi dell'antigene alle nostre difese immunitarie, pronte nuovamente a dividersi in cellule memoria ed effettrici ed a proliferare in una cooperazione sublime tra le varie componenti delle nostre difese, dove ogni tipo cellulare svolge la sua specifica funzione in un mosaico estremamente funzionale, duttile e modulabile.



Presentazione dell'antigene- Tratto da [2].



Molecole di superficie coinvolte nel riconoscimento tra cellule T ed APC- Tratto da [2].

cell markers	cell type					
						
	Langerhans' cells	interdigitating cells	follicular dendritic cells	GCDC	B cells	macrophages
MHC II	+	+	-	+	+	±
FcγR (CD32)	+	-	+	+	+	+
FcγR (CD64)	±	-	-	-	-	+
CD35 (CR1)	+	-	+	+	+	+
CD21	-	-	High	Low	+	+
CD2	-	-	-	+	-	-
CD4	+	-	-	+	-	+
CD1a	+	-	-	-	-	-
CD40	?	High	+	Low	High	+
NSE	-	-	-	-	-	+
Phagocytosis	-	-	-	-	-	+

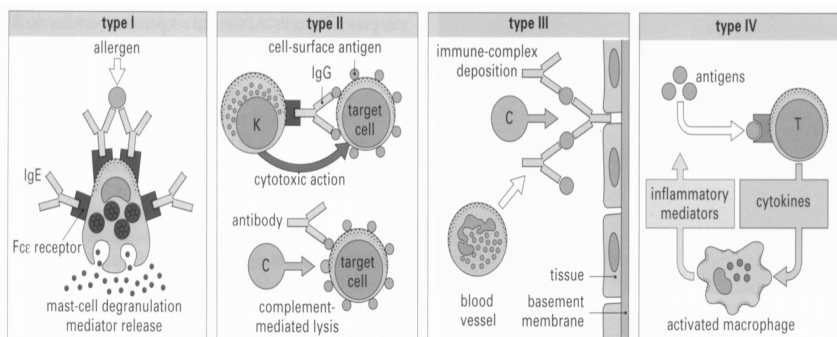
Marker specifici delle principali APC- Tratto da [2].

IL SISTEMA IMMUNITARIO UMANO: il fenomeno delle allergie

Le allergie sono il risultato di un'anomala risposta dell'organismo ad antigeni generalmente ben tollerati dalla popolazione, questi particolari antigeni prendono il nome di "allergeni". Ricordo che circa il 15% della popolazione dei paesi cosiddetti civilizzati soffre di questo disturbo. La reazione allergica si manifesta in modi estremamente variabili, generalmente caratterizzata da un acuto stato infiammatorio delle parti colpite, che porta ad esempio a broncocostrizione ed asma se le parti irritate sono le vie aeree medie e superiori, lacrimazione e congiuntiviti se le parti colpite sono gli occhi, reazione cutanee anche di notevole intensità se è stata colpita la superficie del corpo. In taluni casi la reazione allergica si estende a tutto l'individuo e può portare a morte per sconvolgimento anafilattico, caratterizzato da aumentata permeabilità dei capillari, bassa pressione sistemica, edema diffuso e spasmi della muscolatura liscia, sebbene il quadro clinico sia molto più complesso di come appena descritto. Da notare che si è vista una certa correlazione genetica alle allergie, ma che è evidente l'influenza di fattori esterni nell'istaurarsi del fenotipo allergico vero e proprio [5] [6].

I quattro tipi di ipersensibilità

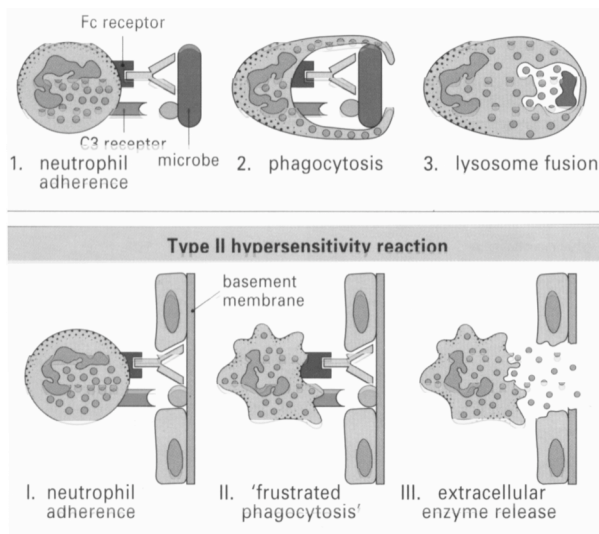
Sono state studiate e classificate quattro tipologie di risposte immunitarie anomale, che portano ad effetti lesivi o dannosi per l'organismo che le porta avanti. Il primo tipo di ipersensibilità è quello comunemente definito allergia, che ho trattato e tratterò particolareggiatamente all'interno dello scritto, si differenzia da tutte le altre in quanto è l'unica forma di ipersensibilità mediata dalle IgE.



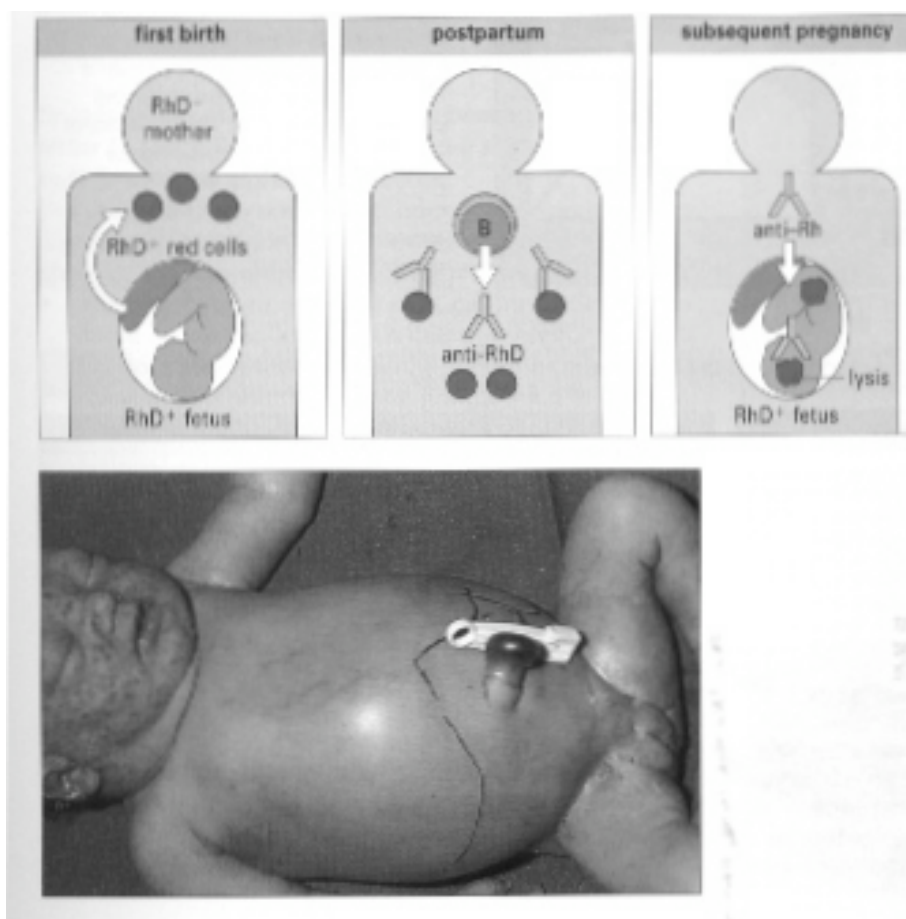
I quattro tipi di ipersensibilità- Tratto da [2].

Poiché il sistema immunitario umano può portare ad anomalie nella risposta differenti dalla allergia, pur utilizzando sempre gli stessi meccanismi di base della difesa immunitaria tipica, mi sembra corretto accennare agli altri tipi di risposte anomale che l'organismo può condurre in sé.

L'ipersensibilità di secondo tipo si manifesta quando IgG od IgM riconoscono come antigeni molecole dell'organismo, generalmente molecole di superficie cellulare o della matrice extracellulare. Questo riconoscimento attiva il complemento che segnala alle cellule effettrici di degradare le componenti riconosciute erroneamente come non proprie. Questo tipo di autoimmunità porta ad uno spettro di patologie molto vasto, dipendente dal tipo di molecole riconosciute; ad esempio la sindrome di Goodpasture, manifestata da nefriti provocate da anticorpi contro le membrane basali nei nefroni; oppure la malattia emolitica dei neonati, che si manifesta quando una madre Rh- partorisce un figlio Rh+ e produce in seguito al parto anticorpi anti-Rh; durante la gestazione di un secondo figlio Rh+, gli anticorpi specifici passano la barriera placentare andando ad incontrare gli eritrociti del nascituro che, poiché presentano la proteina rhesus sulla superficie, vengono riconosciuti come patogeni e degradati; il feto nasce generalmente morto.



Nella figura in alto una risposta normale, nella figura in basso una risposta di ipersensibilità del secondo tipo. - Tratto da [2].

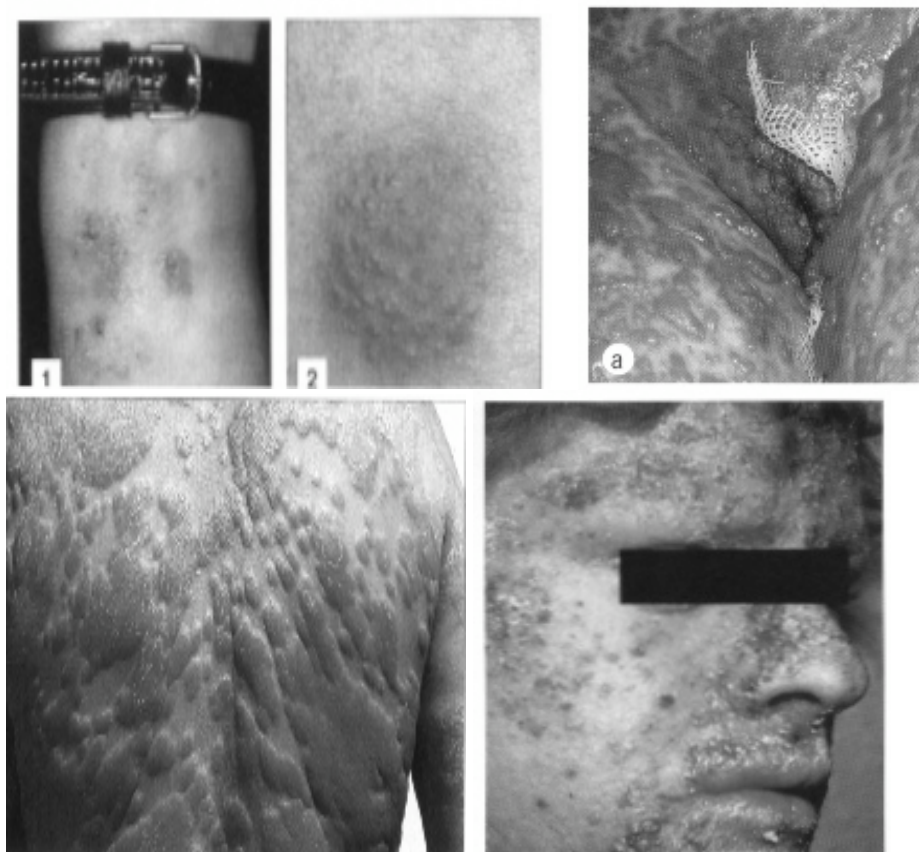


Malattia emolitica del neonato dovuta agli anticorpi anti Rh della madre Rh- nei confronti del feto Rh+ - Tratto da [2].

L'ipersensibilità di terzo tipo è dovuta all'accumulo nel sangue od in tessuti specifici di immunocomplessi precipitati. Generalmente gli anticorpi si legano agli antigeni provocandone l'aggregazione, il complemento ha la capacità di solubilizzare parzialmente gli immunocomplessi, ed il fegato è in grado di eliminarli dall'organismo. Se uno qualunque di questi meccanismi non funziona come dovuto, l'accumulo di questi complessi insolubili porta ad una vasta gamma di patologie, in base al luogo di deposizione. Infezioni persistenti come la malaria, l'epatite virale o la lebbra portano spesso ad accumulo di complessi, aumentando la gravità della patologia d'origine. Spesso questo tipo di ipersensibilità è una complicazione di molte malattie

autoimmuni. Molte forme di artrite o di nefrite sono da attribuirsi a questo meccanismo immune anomalo.

L'ipersensibilità di quarto tipo è mediata da risposte infiammatorie coordinate da linfociti T, è detta comunemente "da contatto", in quanto generalmente la zona irritata è una zona della pelle entrata in contatto coll'antigene. Esistono diversi tipi di ipersensibilità di quarto tipo, generalmente classificate in base all'aspetto della lesione ed al tempo dal contatto necessario per il manifestarsi. Nel topo si è visto che per indurre la reazione in altri individui, bisogna trasferire le cellule T e non gli anticorpi, che risultano indifferenti. In questo si differenzia profondamente dall'allergia (ipersensibilità di primo tipo), dove invece la somministrazione di IgE è in grado di sensibilizzare zone cutanee del ricevente. Nonostante ciò, comunque, vi sono dei punti di contatto tra i meccanismi delle reazioni di ipersensibilità di primo e di quarto tipo, come il coinvolgimento delle cellule T, sebbene questo tipo di risposta anomala si basi molto di più su un tipo di reazione cellulo-mediata piuttosto che concertata tra il compartimento cellulare ed umorale della risposta immunitaria, come avviene invece nel caso delle allergie. Il tempo in cui si manifesta il picco di reazione è molto lungo, addirittura in alcuni casi dopo tre giorni dall'esposizione all'antigene. Questo tipo di reazioni cutanee diviene clinicamente molto grave ad esempio nel caso della lebbra, ed è usato clinicamente per analizzare l'eventuale contatto coll'agente patogeno della tubercolosi, in grado di mostrare in un test di reazione cutanea una reazione di ipersensibilità di quarto tipo; è la cosiddetta erroneamente "antitubercolina" che una volta veniva eseguita in periodo scolastico [6].



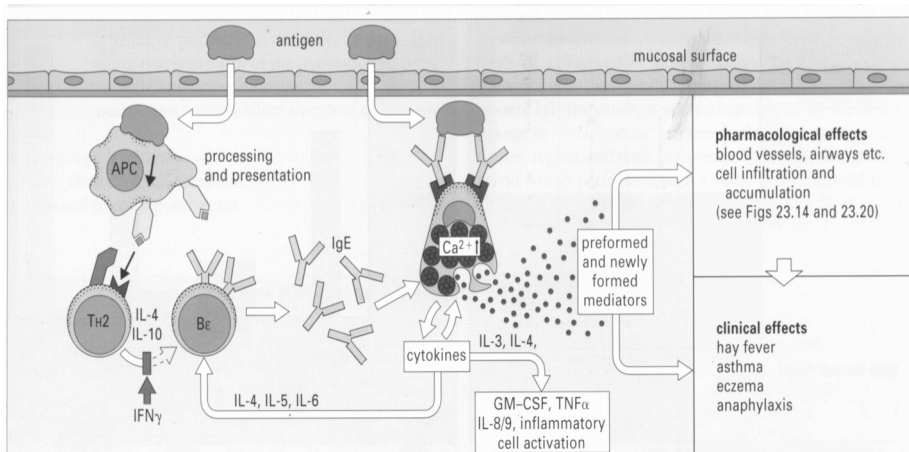
Alcuni esempi di reazioni di 4° tipo di gravità differente- Tratto da [2].

Durante la continuazione di questa tesi mi riferirò col termine allergia solo alla ipersensibilità di primo tipo, salvo detto diversamente espressamente nel testo.

Meccanismi di base.

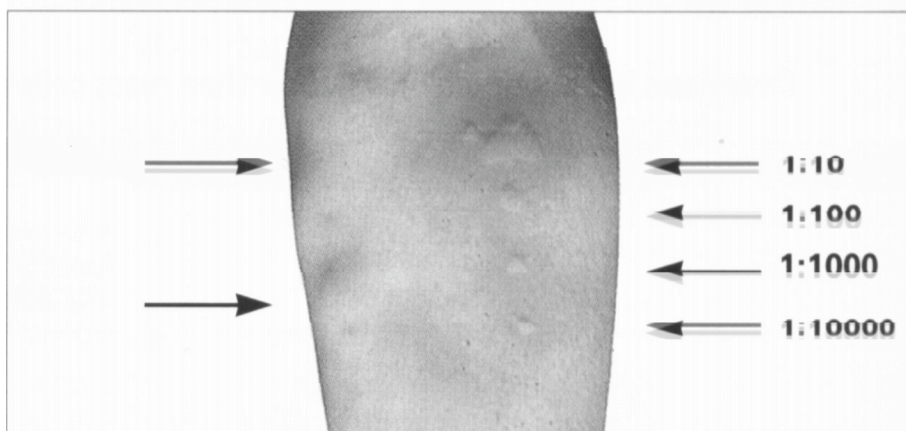
Da un punto di vista molecolare il fenomeno delle allergie è mediato dalle IgE, prodotte dai linfociti B sotto stimolazione delle cellule Th2. Sui mastociti e sui basofili sono presenti recettori detti FcεRI (recettori ad alta affinità per la porzione costante ε), in grado di legare con alta specificità le IgE circolanti. Quando la popolazione di IgE risulta molto arricchita di una singola classe di IgE rivolte verso un solo antigene, è molto probabile che due recettori vicini siano carichi di anticorpi che riconoscono lo stesso antigene e che possano formare un complesso unico. La dimerizzazione di due recettori FcεRI è il segnale che porta al

rilascio delle sostanze infiammatorie, quali l'istamina, contenute nelle vescicole citoplasmatiche; inoltre essa stimola la produzione di altre sostanze proinfiammatorie quali i leucotrieni, che portano al perdurare della reazione di ipersensibilità.



Tratto da [2].

Questo tipo di reazioni sono definite di fase immediata, a queste seguono delle reazioni dette di fase tardiva, dove sostanze chemioattraenti (interleuchina 1 ed altre) permettono a macrofagi, linfociti Th2, basofili ed eosinofili di insinuarsi attraverso le cellule endoteliali, modificando le proteine della membrana cellulare (i leucociti producono selectine che inducono formazione sull'endotelio di ICAM, molecole di adesione cellulare). Superato l'endotelio dei vasi, i leucociti secernono collagenasi ed altre proteasi per potere raggiungere la sede di sintesi del chemioattraente aumentando lo stato infiammatorio in situ. I leucociti sintetizzano il recettore per il chemioattraente sotto stimolo della sostanza stessa, essi divengono più avidi maggiore è il tempo di esposizione alla sostanza, ed è facile immaginare come uno stato duraturo di infiammazione localizzato possa portare ad una notevole migrazione leucocitaria in grado di scatenare risposte di notevole entità; ricordo il caso dell'allergia al veleno dell'ape che provoca edemi e gonfiori di dimensioni più che cospicue, in grado di perdurare nel tempo, e che richiedono spesso l'intervento medico per rischio di crisi anafilattica [6].



A sinistra una reazione tardiva dopo 20 ore dalla somministrazione dell'antigene per via sottocutanea, a destra una reazione di fase immediata. - Tratto da [2].

Le cellule T. Come ambiente e genetica possano influire sull'instaurarsi delle allergie.

Le cellule T svolgono un ruolo importantissimo nell'instaurarsi dell'allergia; si è visto che cellule Th2 creano ambienti citochinici adatti a stimolare la produzione di IgE da parte delle cellule B, invece cellule Th1 sembrano svolgere funzioni protettive, od impedendo l'instaurarsi della reazione di ipersensibilità, o permettendo la creazione di ambienti citochinici ed anticorpali atti a spegnere momentaneamente od addirittura permanentemente la risposta allergica.. Sembra che vi sia una predisposizione genetica alla focalizzazione verso lo spettro citochinico Th1 o Th2, ma le cause ambientali svolgono indubbiamente un ruolo importantissimo; oltre all'aumentato quantitativo di sostanze inquinanti che a parer mio predispongono ad uno stato di irritazione delle vie aeree, si è ipotizzato che il fenomeno delle allergie potesse essere provocato dalle aumentate condizione igieniche che, da una parte, ci preservano dall'essere infestati dai microrganismi generalmente obiettivo delle IgE; dall'altro, una volta che abbiamo iniziato a produrre IgE verso un antigene, ci ritroviamo ad avere una popolazione composta da pochi tipi di IgE, in tal modo i mastociti o cellule equivalenti hanno una probabilità elevatissima di riuscire a formare il ponte tra i recettori e quindi di potere rilasciare i prodotti infiammatori. Paradossalmente studi fatti su popolazioni con condizioni di vita più primitive, hanno portato alla luce che il loro quantitativo di IgE totali sia elevatissimo, ma l'eterogeneità colla quale riconoscevano possibili epitopi portava praticamente a zero la possibilità che si creasse

il ponte di attivazione sui mastociti. E' da notare però che un individuo allergico spesso inizia a manifestare allergia anche verso molecole non correlate, questo fenomeno è da attribuirsi al rapporto tra le citochine Th2/Th1, che può portare cellule B vergini a specializzarsi nella produzione di IgE invece che di IgG. Questa considerazione porta a pensare che molto probabilmente il livello per arrivare a "diluire" sufficientemente le IgE per non potere scatenare una risposta allergica è difficile da raggiungere nelle nostre condizioni di vita. Un ricercatore aveva proposto e realizzato un esperimento dove colonizzazione da parte di vermi intestinali aboliva totalmente le reazioni allergiche negli individui trattati, poiché aveva dato alle IgE ed ai linfociti Th2 il loro target naturale. Altre ipotesi fanno fulcro sull'osservazione che i neonati sono fortemente polarizzati Th2 (madre e feto se polarizzati Th1 probabilmente porterebbero al rigetto del feto), e che il cambio verso il fenotipo Th1 potrebbe essere mediato dall'attacco di una serie di agenti patogeni quali virus e batteri (Th1 stimolanti) che nel nostro mondo civilizzato sono divenuti molto più rari grazie all'aumentata igiene ed all'uso di vaccini. Questo mancato stimolo potrebbe portare al permanere del fenotipo Th2 che successivamente, sotto stimolo di potenziali allergeni, potrebbe indurre ipersensibilità e quindi l'allergia. Ricordo che un potentissimo induttore Th1 è il patogeno della tubercolosi, quasi totalmente debellato oggi, ma quasi endemico sino a pochi decenni or sono.

Uno studio condotto da von Mutius e colleghi ha evidenziato che il ruolo dell'inquinamento, seppure giochi un ruolo nell'instaurarsi del fenotipo allergico, non è la causa scatenante dell'epidemia nel mondo occidentale. Una volta che le Germanie sono ridiventate una, i ricercatori hanno potuto fare degli studi comparativi tra bambini in età scolastica che vivevano a Munich (tenore di vita più elevato e poco inquinata, Germania dell'ovest) e Leipzig (tenore di vita più basso e molto inquinata, Germania dell'est); sorprendentemente la frequenza di bambini allergici era di molto inferiore nelle scuole di Leipzig piuttosto che nella pulita Munich, inducendo fortemente a pensare che i fattori protettivi forniti da condizioni igieniche più scadenti siano più condizionanti rispetto ai fattori debilitanti indotti dal solo inquinamento atmosferico, almeno per quanto riguarda l'evolversi delle allergie [5] [7]. Studi condotti successivamente hanno portato alla luce che questo tipo di osservazioni sono estendibili anche ad altre realtà cittadine, tanto che durante il processo di occidentalizzazione della ex Germania dell'est si è potuto evidenziare un aumento dell'incidenza delle allergie nei

bambini in età scolastica. Molto probabilmente lo stile di vita occidentale porta alla creazione di un ambiente favorevole all'istaurarsi del fenotipo allergico nell'uomo. Altri studi fatti sia in Europa che in Africa hanno evidenziato che uno stile di vita rurale predispone meno verso l'istaurarsi di risposte immunitarie anomale rispetto ad uno stile di vita cittadino. Altri studi ancora hanno evidenziato che bambini che vivono in fattorie con animali o che semplicemente convivono con animali domestici sono meno esposti al rischio di evolvere risposte allergiche. Altri studi ancora però hanno dimostrato ad esempio che le particelle di diesel presenti nell'aria inquinata da idrocarburi parzialmente combusti aumentano il rischio di allergia, in quanto possono caricarsi di molecole allergeniche e veicolarle in maniera più efficiente al sistema respiratorio, tendendo maggiormente ad indurre una risposta Th2 invece che Th1. In ogni caso però sono evidenti delle correlazioni genetiche all'istaurarsi di questa patologia; si è visto che gemelli umani monozigoti hanno il 75% di probabilità di coevolvere una risposta allergica, se uno dei due risulta affetto. E' evidente che figli di pazienti allergici hanno una maggiore probabilità di divenire allergici essi stessi rispetto a bambini con una mancante storia familiare per questa patologia. Sono stati condotti molti studi per riuscire ad identificare pochi geni discreti responsabili dell'istaurarsi della malattia, ma sono stati trovati solo alcuni possibili candidati che, più che altro, tendono lievemente a predisporre l'individuo; è molto probabile che dalla copresenza di molti di questi fattori debolmente inducenti si venga a creare un assetto genetico fortemente inducente l'istaurarsi dell'allergia. In più si è constatata una certa possibilità di induzione sul feto e sul neonato da parte della madre, prima durante la gestazione durante il colloquio colla placenta, successivamente dovuto alle proteine, ed alle immunoglobuline, sciolte nel latte ed assunte dal bambino; secondo alcuni studi, le uniche immunoglobuline secrete oltre alle IgA all'organismo sono proprio le IgE, ad eccezione del latte materno dove è alta la presenza di IgG.

Risulta evidente che l'istaurarsi del fenotipo allergico è da attribuirsi ad una predisposizione familiare multigenetica, dalle condizioni di vita e dall'ambiente Th1 o Th2 stimolante, ed è solo dal bilancio tra questi fattori che si può cercare l'effettivo contesto responsabile dell'istaurarsi di questa malattia, che nei soli USA porta ad una spesa annua superiore ai cinque miliardi di dollari e che mina profondamente la qualità della vita umana, soprattutto colpendo i più piccoli della nostra razza. Il

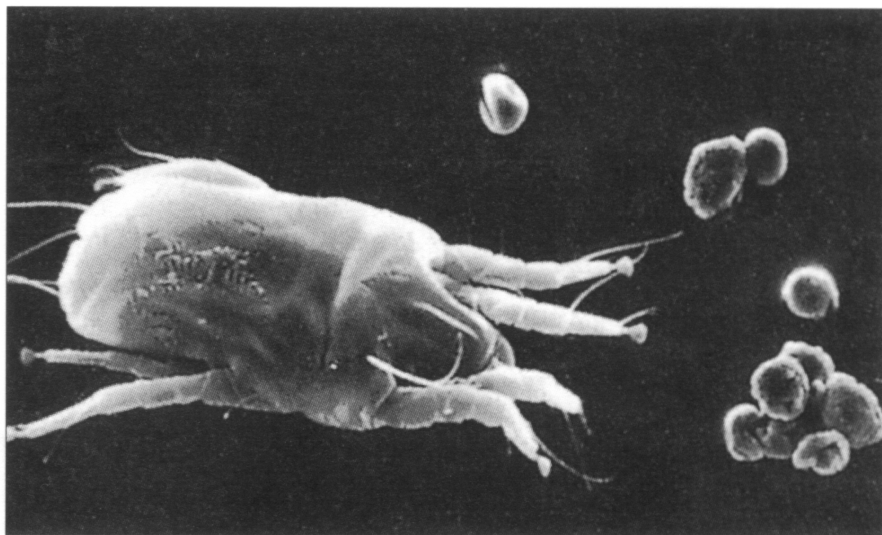
problema risulta purtroppo in crescita e non in diminuzione, avendo raggiunto un'entità tale da risultare realmente preoccupante [5] [6].

I linfociti B.

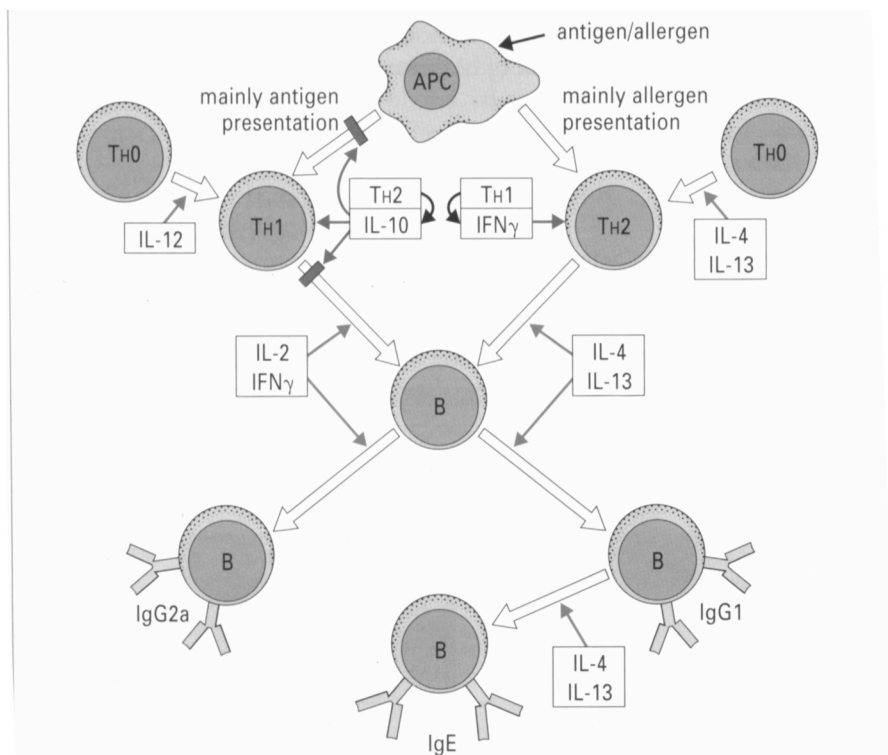
Le cellule B in base all'ambiente citochinico possono essere indirizzate verso riarrangiamenti somatici che le portano a produrre IgE, sotto stimolazione Th2, od IgG, sotto stimolazione Th1. Si è visto che una classe di immunoglobuline dette IgG4, prodotte sotto stimolazione Th2, è in grado di svolgere una notevole funzione protettiva nei confronti dell'allergia, probabilmente competendo per gli stessi epitopi. In soggetti trattati colle varie terapie evolutesi, il quantitativo di IgE rimane costante anche dopo la scomparsa del fenotipo allergico, invece il quantitativo di IgG4 risulta quasi sempre molto aumentato. Da notare che i linfociti B presentano sulla loro superficie il FcεRII (recettore a bassa affinità), se riescono a caricarsi di IgE e tramite queste riconoscere, internalizzare ed esporre l'antigene fungendo da APC, è molto probabile che nel microambiente dove sono avvenute queste interazioni incontrino cellule Th2 e che anch'esse quindi siano indotte verso la produzione di IgE.

Si è visto che per l'espressione delle IgE è indispensabile che i linfociti B posseggano un CD40 funzionale e che il percorso mediato da NF-κB sia funzionale. Anche alcune componenti del recettore per l'interleuchina 4 sono, ovviamente, indispensabili per poter tradurre il segnale IgE inducente, mediato dalla citochina, sino al nucleo (via STAT6). Inoltre cellule B attivate esprimono CD86, che riconosce specificatamente il recettore CD28 delle cellule T, il cui contatto sembra mediare fortemente la produzione di IgE da una parte e la secrezione di citochine Th2 dall'altro. Si è visto che un particolare allergene detto Der p 1 (da *Dermatophagoides pteronyssinus*), con un meccanismo enzimatico, taglia specificatamente, in topo, il recettore CD23, interrompendo probabilmente una delle principali vie inibitorie negative della produzione di IgE, e provocando una forte risposta allergica mediata da un'elevata produzione di immunoglobuline. Ricordo che l'agente allergoferente in questione è il comune agente dell'allergia da polvere, una delle cause più diffuse di fenomeni allergici respiratori, quali l'asma. In alcuni studi si è però evinto che in particolare condizioni il segnale mediato da CD23 risulta essere favorevole alla produzione dei mediatori proinfiammatori, confermando che le vie di segnalazione intracellulari sono particolarmente complesse e soprattutto intercomunicanti ed intrecciate. Si è pensato che una

sovrastimolazione del CD23 dia un segnale negativo alla produzione di IgE, mentre una stimolazione blanda ne induca la produzione. Tutto ciò trova un possibile riscontro nel dato sperimentale che una esposizione prolungata all'allergene in dosi elevate tende a spegnere la risposta allergica, metodo utilizzato nella terapia ITS. Ricordo che CD23 è un recettore che si carica di IgE e tramite queste riconosce l'antigene e trasduce il segnale all'interno del linfocita B [4] [6].



Dermatophagoides pteronyssinus - Tratto da [2].



Controllo citochinico su linfociti B - Tratto da [2].

I mastociti.

I mastociti sono attivati solo alla seconda esposizione all'antigene, in quanto devono prima caricare sui propri recettori le IgE prodotte da linfociti B al primo contatto coll'antigene. Da notare che ad una seconda esposizione i linfociti B producono una nuova ondata di immunoglobuline. Le IgE circolanti hanno una vita media di circa due o tre giorni, invece quelle ancorate ai recettori dei mastociti permangono anche per alcuni mesi, questo spiega come un individuo possa rimanere sensibilizzato all'allergene e dare una risposta immediata anche dopo molto tempo dall'ultimo contatto colla molecola allergenica. Ricordo un esperimento di Stanworth: egli aveva sensibilizzato dodici porzioni di pelle del suo braccio col siero di un paziente allergico; successivamente aveva saggiato una volta la settimana nell'arco di tre mesi di volta in volta una di queste zone rese sensibili con l'allergene di interesse: anche l'ultimo test mostrava una risposta marcata, ciò a dimostrare che le IgE rimangono legate ai mastociti locali della pelle per lungo tempo. Un mastocita, attivato dal ponte tra i recettori per le IgE, subisce un aumento della concentrazione dello ione calcio

bivalente intracellulare, tramite la via della fosfolipasi C, che provoca rimodellamento del citoscheletro ed esocitosi dei granuli citoplasmatici che contengono istamina, principale responsabile della risposta allergica, che provoca vasodilazione e vasopermeabilizzazione e che provoca contrazione della muscolatura liscia intestinale e bronchiale, provocando asma, oltre alla aumentata secrezione di muco. Altre sostanze contenute nei granuli sono l'eparina, anticoagulante, una proteasi a vita media molto breve che svolge la sua funzione solo in situ detta α -triptasi, ed una chimasi che porta ad ipertensione (convertendo l'angiotensina I in angiotensina II) e che digerisce parzialmente il collagene di tipo IV rendendo meno compatte le giunzioni tra derma ed epidermide. Dopo il rilascio di questi mediatori vengono attivate delle vie di biosintesi di sostanze proinfiammatorie (tramite la via dell'acido arachidonico) quali i leucotrieni, anche anticoagulanti, e le prostaglandine, che hanno effetti simili all'istamina ma servono anche da chemioattrattori per gli eosinofili. I mastociti inoltre rilasciano interleuchina 5 e GM-CSF che servono anch'essi ad attrarre gli eosinofili in situ, ma fungono anche da segnali per aumentarne la sopravvivenza; ed interleuchina 4 e 13, citochine tipiche dello spettro Th2 [6].

I basofili.

I basofili presentano una serie di omologie di funzione coi mastociti, sebbene la loro funzione spesso venga svolta in un tempo più tardo. Presentano sulla loro superficie solo il recettore ad alta affinità per le IgE e rispondono all'attività chemiotattica dell'interleuchina 3 e 4 e del GM-CSF per la migrazione nelle zone dove rilasciano granuli ricchi di istamina ed in un tempo più tardo sintetizzano leucotrieni. Anch'essi rilasciano alcuni mediatori tipici Th2 quali interleuchina 4 e 13. basofili coltivati insieme a linfociti B inducono fortemente la produzione da parte di quest'ultimi di IgE [6].

Gli eosinofili e la risposta tardiva.

Gli eosinofili sono cellule richiamate nel sito di infiammazione da una serie di chemioattrattori; arrivati nei tessuti, sotto stimolo delle proteine della matrice, si mantengono grazie ad un ciclo autocrino grazie ai fattori trofici interleuchina 5 e GM-CSF da esse prodotte, oltre ad un'altra serie di sostanze prodotta da altre cellule bianche copresenti in situ. Inoltre gli eosinofili producono un quantitativo di interleuchina 4 tale da riuscire a mediare in situ risposte Th2. Sotto stimolazione gli

eosinofili vanno incontro a necrosi, rilasciando nell'ambiente una serie di composti altamente reattivi contenuti nei granuli che portano alla formazione di ROS (intermedi reattivi dell'ossigeno), ed altre sostanze con effetti antimicrobici, citotossici (proteine basiche dei granuli) ed infiammatori.

Da notare che è a causa della degranulazione degli eosinofili che si manifesta una risposta tardiva. Queste cellule permangono in situ provocando uno stato di infiammazione in un tempo più tardo, provocando o reazioni allergiche a distanza di tempo o portando un tessuto ad uno stato di infiammazione cronico. Ad esempio, durante test di reazioni cutanee, dove si valuta il grado di allergia in risposta ad un allergene ponendo sulla pelle abrasa un allergene e valutando le dimensioni del ponfo che ne scaturisce, spesso dopo la scomparsa della reazione se ne evidenzia una ricomparsa dopo alcuni minuti o dopo alcune ore, evento da attribuirsi proprio all'azione degli eosinofili che rilascino le loro sostanze proinfiammatorie in un tempo più tardo. Altro esempio è il danneggiamento del tessuto polmonare con accumulo di collagene che porta ad uno stato patologico cronico, da attribuirsi sempre all'azione lesiva mediata dagli eosinofili che perdura nel tempo ed altera i normali processi di rigenerazione dell'organismo, potendo porre in tal modo gli individui in uno stato di malessere irreversibile, i cui danni minano profondamente la qualità della vita dei soggetti colpiti in modo profondo, aumentando la gravità di patologie quali l'asma, spesso associata a reazioni allergiche che colpiscono appunto l'apparato respiratorio [6] [8].

I macrofagi

I macrofagi presentano il recettore per le IgE a bassa affinità, e possono rilasciare una serie di sostanze proinfiammatorie quali i leucotrieni e le prostaglandine, sia antiinfiammatorie, quali l'interleuchina 10; inoltre sono in grado di secernere una serie di citochine tipiche sia della risposta Th1 che di quella Th2, ovvero presentano un tipo di possibile polarizzazione paragonabile a quella delle cellule Th, dipendente dal microambiente nel quale si realizza la loro attivazione. Macrofagi attivati producono e rilasciano anch'essi ROS, oltre a produrre ossido nitrico che svolge funzioni trofiche sugli eosinofili, istolesive e polarizza le cellule T verso il fenotipo Th2. Soggetti predisposti alle allergie hanno quantitativi di ossido nitrico maggiori di soggetti normali, correlato ad una aumentata sintesi di ossido nitrico sintetasi, condizione particolarmente stressata nel caso di asma allergico [6] [8].

Il tessuto polmonare.

Uno dei tessuti più colpiti dalle allergie è il tessuto polmonare, in quanto esposto agli agenti esterni con una vasta superficie altamente vascolarizzata e quindi molto ricca di cellule bianche del sangue. In soggetti predisposti alle allergie i macrofagi presenti nel tessuto polmonare svolgono bene il ruolo di APC, attivando molto le cellule T eventualmente presenti; in soggetti normali i macrofagi invece impediscono alle cellule dendritiche, per competizione, di fagocitare e presentare gli antigeni, evitando una sovrastimolazione delle cellule T e quindi l'instaurarsi di una deleteria iperreattività. La reazione allergica ha fine quando l'interleuchina 10 antiinfiammatoria spegne il focolaio di infiammazione, in tal modo può avvenire la ricostruzione dei tessuti danneggiati durante la risposta immunitaria/allergica; nel caso di infiammazioni croniche o frequenti, come accennato, l'equilibrio fisiologico di riparazione viene alterato e si evidenzia un'alterazione istologica del tessuto stesso, con perdita di elasticità ed accumulo di collagene, che può anche portare ad esempio ad un progressivo restringimento delle vie aeree [8].

Note.

Mi sembra importante ribadire che la reazione allergica, come qualunque risposta immunitaria tipica, necessita di due tempi per instaurarsi; un primo contatto coll'antigene, od allergene in questo caso, che sensibilizza il soggetto; una seconda esposizione che provoca la reazione allergica propriamente detta, con tutta la sintomatologia analizzata.

Uno degli aspetti più pericolosi dell'allergia è la possibilità di reazioni crociate, ovvero si può rispondere ad un allergene nuovo come se già incontrato se questi allergeni condividono alcuni epitopi; visto che esistono famiglie di molecole allergeniche correlate dal punto di vista strutturale, non è una problematica da sottovalutare. Sia da un punto di vista alimentare che dal punto di vista delle medicine di sintesi la possibilità di trovare molecole affini non è bassa, ed in alcune condizioni, come in una sala operatoria, non è problematica da poco avere di fronte un individuo in preda ad una crisi allergica. Sebbene esistano delle leggi che cercano di tutelare parzialmente gli individui, il problema delle allergie è spesso sottovalutato ed è una delle prime cause di morte per complicazioni operatorie.

Vi sono dati che evidenziano non solo casi di asma non mediati dalle IgE, ma anche casi di crisi anafilattiche, portando a pensare che sebbene il meccanismo illustrato sia indubbiamente il più diffuso, esistano vie alternative o parallele per l'instaurarsi di una risposta allergica o pseudotale.

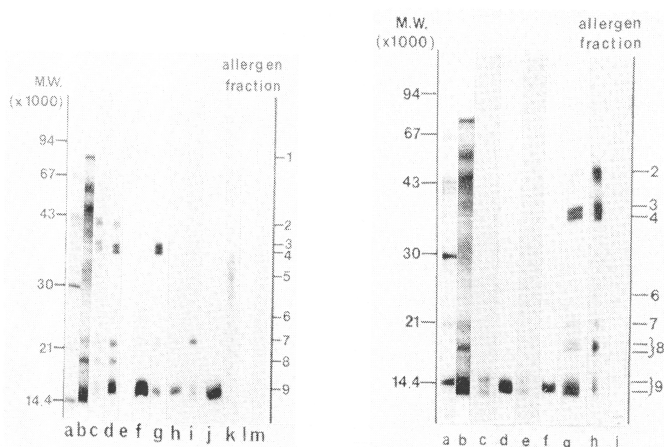
PREMESSE AL LAVORO

L'isolamento e la successiva caratterizzazione dell'allergene Par j 3 della *Parietaria judaica* è da inserirsi in una ricerca protrattasi negli anni dai gruppi di ricerca del CNR di Palermo collo scopo di isolare e caratterizzare i vari allergeni presenti nel polline di questa diffusissima pianta che provoca spesso nella popolazione crisi allergiche di notevole entità [9-17]. L'obiettivo di questi studi è il potere applicare le conoscenze neoconseguite per la formulazione di terapie antiallergiche efficienti, poco costose e di minimo danno ai pazienti. Sino ai nostri giorni la tecnica più utilizzata è l'immunoterapia specifica, detta ITS, che consiste nel somministrare per via sottocutanea dosi crescenti per lunghi periodi di tempo di allergene nativo, atto a desensibilizzare i pazienti nei confronti degli allergeni contenuti nell'agente allergoferente. Nel caso della *Parietaria judaica* viene somministrato un estratto crudo totale di polline, con due grossi svantaggi: la difficile titolazione degli effettivi allergeni e la somministrazione di tutti gli allergeni presenti nel polline. Una volta conosciuti a fondo gli allergeni presenti nella pianta e potendoli produrre colla tecnologia del DNA ricombinante queste due imperfezioni nella metodologia tradizionale potrebbero essere facilmente superate: in primo luogo sia la quantificazione che la purificazione di proteine ricombinanti risulta molto più semplice ed efficiente di quelle native; in secondo luogo verrebbero somministrate al paziente solo le proteine allergeniche e non tutte le proteine presenti nel polline; inoltre sarebbe facile creare sistemi in vitro per analizzare il siero del paziente e potere evincere a quali allergeni egli è realmente allergico. Grazie a questo tipo di analisi potrebbero venirgli somministrati solo quelli a cui risulterebbe positivo, evitando che possa venire sensibilizzato a rispondere a potenziali allergeni a cui egli risulti inizialmente immune. Anche in questo risiede l'importanza di riuscire a conoscere ed a caratterizzare tutti gli allergeni presenti nel polline della *Paritaria judaica*. Ricordo che col protrarsi della ITS si raggiungono quantitativi di sostanze somministrate notevoli [18] [19].

Analisi dell'estratto crudo di polline di Paritaria judaica.

Studi condotti in precedenza hanno portato ad isolare e caratterizzare delle potenti molecole allergeniche contenute nella *Parietaria judaica*; in un gel SDS PAGE queste molecole migrano principalmente in una larga banda tra i 10 ed i 14 chilodalton, concentrandosi in due zone

distinte; ognuna di queste zone identifica una famiglia di proteine differente, nominata l'una Par j 1, l'altra Par j 2. Della prima sono state trovate 3 isoforme dette Par j 1.0101, Par j 1.0102 e Par j 1.0201. [20] [21] [22]



Nella figura possiamo notare, nella colonna a e nella colonna b, estratto crudo totale del polline di *Parietaria judaica* analizzato per SDS-PAGE, trasferito su nitrocellulosa e colorato con amido black, si possono notare moltissime bande più o meno discrete per tutto l'intervallo tra i 14.400 ed i 94.000 dalton di massa. Le altre colonne sono esami autoradiografici effettuati su strisce incubate con singoli sieri di pazienti, le cui IgE, come si evince dalla figura, riconoscono quasi tutte la zona a basso peso molecolare, ma riconoscono in modo differente da paziente a paziente le molecole a peso molecolare più elevato.

Par j 1.0101 è il clone trovato dopo analisi di una libreria di espressione di cDNA di estratto totale di polline di *Parietaria judaica* in λ zap usando come sonda sieri, e quindi le IgE contenute in essi, di pazienti allergici. E' una molecola a lunghezza incompleta. La molecola proteica codificata da questo clone risulta essere di 139 aminoacidi con una massa molecolare di 14509 dalton.

Par j 1.0102 è il clone a lunghezza completa trovata, codificato da un frammento di DNA di 794 nucleotidi, con una sequenza aminoacidica dedotta di 176 aminoacidi ed una massa di 18450 dalton. La proteina processata e matura contiene 139 aminoacidi ed ha una massa di 14726 dalton.

Par j 1.0201 è una variante corta dell'allergene, codificata da un frammento di DNA di 637 nucleotidi, con una sequenza aminoacidica

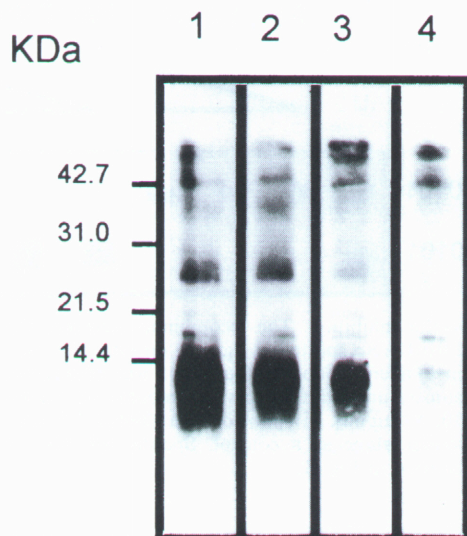
dedotta di 139 aminoacidi ed una massa di 14400 dalton. La proteina processata e matura è di 103 aminoacidi ed una massa di 10677 dalton.

Par j 2.0101 è un clone di 622 nucleotidi, che codifica per Par j2, con una sequenza aminoacidica dedotta di 133 aminoacidi ed una massa di 14105 dalton. La proteina processata e matura è di 103 aminoacidi ed ha una massa di 11344 dalton.

Par j 1.0102 e Par j 1. 0201 mostrano una omologia di sequenza nucleotidica della regione codificante del 91% ed una omologia aminoacidica dell'89%, ma, poiché non v'è omologia né nel 3' né nel 5' non tradotto, molto probabilmente sono codificati da geni distinti.

Par j1 e Par j 2 mostrano una omologia di sequenza nucleotidica della regione codificante per la proteina matura del 45%, concentrata nella regione aminoterminale. Il peptide segnale aminoterminale a monte contiene la sequenza codificante per trentasei aminoacidi che mostrano una caratteristica sequenza segnale per la glicosilazione posttraduzionale delle proteine eucariotiche.

Da un punto di vista immunologico Par j 1 è riconosciuto dal 95% circa dei pazienti allergici, ed è in grado di bloccare in un test di competizione ELISA il 40% delle IgE; invece Par j 2 è riconosciuto dall'82% dei pazienti ed è in grado di bloccare il 35% delle IgE nello stesso tipo di test ELISA. Analisi di inibizione effettuati tramite trasferimento su membrane di nitrocellulosa ed analisi Western, mostrano che le due proteine non presentano reattività crociata, probabilmente la loro composizione in epitopi è differente, tranne per i primi 30 aminoacidi della regione aminoterminale che ha mostrato avere un epitopo condiviso [16]. Incubazione di un gruppo di sieri con le due proteine ricombinanti porta alla quasi totale scomparsa del segnale nella regione tra 10 e 14 chilodalton, portando a pensare che questa regione che rispondeva così fortemente ai sieri dei pazienti allergici fosse formata esclusivamente da queste due molecole allergeniche [23].



Western blot di estratto crudo di polline di *Parietaria judaica*

1) incubato con miscela di sieri di pazienti allergici

2) incubato con miscela di sieri di pazienti allergici preincubato con Par j 1 ricombinante

3) incubato con miscela di sieri di pazienti allergici preincubato con Par j 2 ricombinante

4) incubato con miscela di sieri di pazienti allergici preincubato con Par j 1 e Par j 2 ricombinante

Al momento attuale, la conoscenza delle singole molecole di interesse risulta ancora incompleta, e l'obiettivo della mia tesi è quello di caratterizzare un nuovo allergene della *Parietaria judaica*, ed il suo clonaggio con l'uso della tecnologia del DNA ricombinante, con gli enormi vantaggi terapeutici di cui parlerò successivamente. Analisi condotte su banche di dati informatici (la EMBL) ha portato a conoscenza che sia Par j1 che Par j 2 appartengono alla famiglia delle proteine trasportatrici di lipidi non specifiche, ovvero molecole che presentano una tasca lipofila capace di adattarsi per poter accogliere molecole idrofobiche di dimensione e struttura varia e di permetterne l'attraversamento delle membrane. La tasca è costruita da un foglietto β e da una serie di quattro α eliche la cui struttura tridimensionale ha una aumentata stabilità mediata da quattro ponti disolfuro, tra otto cisteine, con un grado di conservazione elevatissimo all'interno di tutta questa famiglia di trasportatori [16] [24].

Constatato che Par j1 e Par j 2 insieme sono in grado di sequestrare la maggior parte delle IgE dei pazienti allergici, si è ritenuto opportuno utilizzare per le analisi immunologiche successive, gruppi di sieri privati degli anticorpi specifici per queste due potentissime molecole allergeniche; ciò per riuscire ad ottenere dei sieri arricchiti di IgE in grado di riconoscere gli altri allergeni presenti tra le proteine del polline della *Parietaria judaica*, altri allergeni di cui, come dimostrerò, Par j 3 fa parte.

MATERIALI E METODI

Analisi di una libreria di espressione in λ ZAPII con sieri di pazienti allergici

Si utilizzano grandi piastre quadrate riempite con agar di fondo addizionato di magnesio tenute a temperatura costante di 37°C. Si fa avvenire l'infezione incubando insieme in liquido (LB) un'aliquota di batteri XL1-Blue con un'aliquota di libreria fagica per 15' a 37°C. Si mescola il liquido infettato con una soluzione di agarosio di superficie mantenuta a 55°C per mantenere la soluzione liquida, ma che permette la sopravvivenza dei batteri per un po' di tempo, tempo sufficiente per piastrare i batteri sopra le piastre e lasciare solidificare il tutto. Le piastre quindi vengono poste a 42°C sino alla comparsa delle placche di infezione, ovvero per circa 6 ore. Sulla piastra si posizionano filtri di nitrocellulosa imbevuti di IPTG (isopropil- β -tio-galattoside) 10mM che inducono la produzione della proteina di interesse nei batteri infettati. Dopo di ciò le piastre vengono messe a 37°C per circa 4 ore e poi a 4°C per 3 ore. Presi i riferimenti si incuba la membrana in agitazione con una soluzione di PBS 1x contenente 3% di albumina sierica bovina, 0,5% Tween20, 0,02% di NaN₃ per un'ora. La membrana viene lavata per 3 volte per 5' in agitazione con PBS 1x addizionato di Tween20 0,1% ed incubata per tutta la notte con singoli sieri o miscele di sieri di pazienti diluiti 1:5 con una soluzione PBS 1x finale addizionata di 0,25% di albumina sierica bovina, 0,1% Tween20, 0,02% NaN₃ in agitazione. L'indomani la membrana viene lavata per tre volte per 5' con PBS 1x finale addizionato di Tween20 0.1% in agitazione ed incubata per un'ora con anti-IgE coniugate con perossidasi di rafano, diluita 1:10.000 in PBS 1x finale addizionato di 0,25% di albumina sierica bovina e 0,1% Tween20 in agitazione. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS 1x finale addizionato di Tween20 0,1% la membrana viene analizzata per chemiluminescenza tramite Super Signal®, secondo le informazioni fornite dalla ditta fornitrice.

LB per litro di soluzione: 10 grammi di NaCl, 5 grammi di Bacto-Yeast, 10 grammi di Bacto-triptone;

per agar di fondo aggiungere 1,5% peso/volume di agar ad LB

per agar di fondo con magnesio aggiungere solfato di magnesio 10 mM finale

per agarosio di superficie aggiungere 0,7% di agarosio ad LB

PBS 10 x per litro di soluzione 8 grammi di NaCl, 0,2 grammi di KCl, 1,44 grammi di Na₂HPO₄, 0,24 grammi di KH₂PO₄, portare a pH 7,4 con HCl, portare a volume ed autoclavare.

Marcatura radioattiva di un frammento di DNA con inneschi casuali

Si denatura al calore il frammento di DNA di interesse da marcare e lo si mette in ghiaccio per impedirne la rinaturazione. Si incuba con il frammento di Klenov della DNA polimerasi, in presenza di tre nucleotidi trifosfati freddi ed uno marcato in α con P³², e con esanucleotidi casuali utilizzando il tampone salino e le condizioni consigliate dalla ditta fornitrice (Pharmacia, Amersham, UK).

Analisi di cloni col metodo Southern

Cloni risultati positivi per il loro legame con le IgE umane sono stati amplificati tramite PCR utilizzando gli inneschi specifici delle braccia del vettore fagico (30 cicli di 94°C 1', 60°C 1', 72 °C 1') e sono stati fatti correre in un gel di agarosio all' 1% in presenza di etidio bromuro 0,5 µg/ml. Successivamente il gel è stato trattato con una soluzione di depurinazione (1,1 % di HCl in acqua distillata) per 15', poi con una soluzione di denaturazione (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) per 30', poi con una soluzione di neutralizzazione (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5); infine il gel è stato equilibrato con 2x SSC (88,23 grammi di trisodio citrato, 175,32 grammi di NaCl in un litro di soluzione finale, portare a volume con acqua distillata; il pH finale dovrebbe essere compreso tra 7 ed 8). Per fare avvenire il trasferimento si impilano a partire dal basso verso l'alto il gel stesso, un foglio di nylon (Hybond N+, Amersham, UK) di dimensioni opportune ottimizzato per il trasferimento degli acidi nucleici imbevuto in 2X SSC, 3 fogli di carta 3MM asciutti, circa quattro centimetri in altezza di carta assorbente, un lieve peso per compattare il tutto. E' importante che non vi sia formazione di bolle tra il gel e la membrana di nylon. Dopo circa un'ora la membrana viene prelevata, asciugata a temperatura ambiente ed esposta ad una lampada UV ad alta energia per fare avvenire il legame covalente degli acidi nucleici colla membrana. Dopo di ciò la membrana viene equilibrata in un tampone di ibridazione (5X SSC, 5X Deinhart, 0,5%SDS) per 2 ore a 65°C. In seguito la sonda radioattiva precedentemente preparata viene denaturata al calore e posta in ghiaccio, quindi viene aggiunta alla miscela di preibridazione. Il filtro viene incubato a 65°C in agitazione per 14-16 ore. Passato questo

periodo, la membrana viene lavata ripetutamente con soluzioni scalari di un tampone contenente inizialmente 2x SSC e 0,1% SDS sino ad una concentrazione salina 0,2x SSC e 0,1% SDS. La membrana viene quindi posta all'interno di una camera per autoradiografia ed esposta per 4-6 ore a -80°C .

Sequenziamento di un clone di DNA

Per tutte le procedure di sequenziamento resesi necessarie durante il percorso di lavoro, si è adoperato il metodo di Sanger (altresì detto dei didesossi).

Protocollo 3' RACE e 5' RACE

Si tratta l'RNA di partenza (da 1 a 5 μg) con fosfatasi intestinale di capra (CIP) secondo le indicazioni date dal fornitore, in grado di rimuovere il pirofosfato al 5' terminale dei messaggeri non incappucciati. Successivamente gli RNA purificati vengono trattati con fosfatasi acida di tabacco (TAP) secondo le indicazioni date dal fornitore, in grado di rimuovere il cappuccio dagli mRNA ma lasciando legato al messaggero il pirofosfato al 5' terminale. Successivamente gli RNA purificati nuovamente vengono ligati al 5' con oligonucleotidi specifici forniti dalla ditta, sempre seguendo il protocollo standard. Viene fatta seguire una amplificazione di retrotrascrizione dove l'oligo che si appaia al 3' aggiunge una sequenza nota oltre la coda di poly-A. Il protocollo è ottimizzato per ottenere amplificati di DNA a doppio filamento, derivati solo ed esclusivamente dai messaggeri con cappuccio e poly-A⁺, ovvero messaggeri completi e non troncati. Inoltre il protocollo permette di ottenere filamenti di DNA che posseggono sequenze note aggiuntive sia al 5' che al 3', espediente che permette di amplificare o l'intero messaggero, o, conoscendo porzioni di sequenza interne, permette di amplificare le estremità; in tal modo se vi è dubbio sull'integrità di cloni isolati precedentemente, risulta possibile ottenere amplificati specifici delle estremità derivate solo ed esclusivamente da messaggeri a lunghezza completi, amplificati che dopo sequenziamento permettono di fugare ogni possibile dubbio. Inoltre ancora per ogni sequenza aggiunta alle estremità, la ditta produttrice fornisce due oligonucleotidi differenti che possono fungere da inneschi, parzialmente sovrapposti, ma l'uno più interno dell'altro; in tal modo è possibile fugare la possibilità di amplificazioni casuali dovute alla variabilità intrinseca della sequenza nucleotidica degli acidi nucleici, in quanto per ogni amplificazione vi è la possibilità di

adoperare un controllo interno, e la differenza di lunghezza degli amplificati è una costante se non sono avvenuti errori durante la procedura di amplificazione o condizioni straordinarie in cui è avvenuta la stessa.

5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA3'

Oligo di RNA al 5'

5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA3'

Innesco esterno al 5'

5'GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA3'

Innesco interno al 5'

5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAAACGGCATGACAGTG(T)₁₈3'

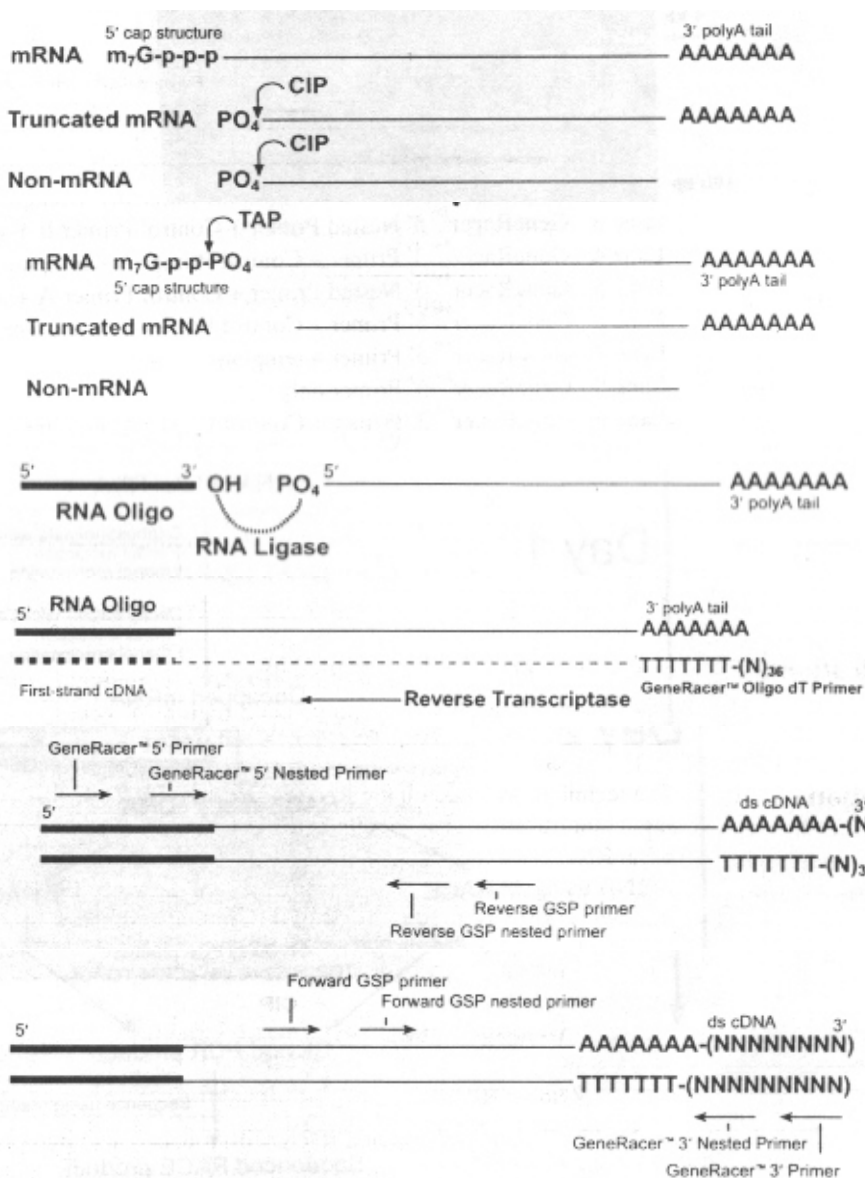
Oligo di DNA al 3'

5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAAACG3'

Innesco esterno al 3'

5'CGTAACGGCATGACAGTG3'

Innesco interno al 3'



Tratto dal manuale del Generacer™.

Elettroeluzione di un frammento di DNA da gel di agarosio

Si prepara una soluzione in TBE 1x finale contenente una concentrazione finale di agarosio 1% peso/volume finale (per frammenti di differenti dimensioni la concentrazione finale di agarosio può variare). La soluzione si scalda per permettere la solvatazione dell'agarosio. Quando la temperatura diminuisce si aggiunge etidio bromuro alla concentrazione finale di 0.5 µl/ml per permettere la visualizzazione dei frammenti di DNA sotto la radiazione di una lampada UV. Viene imposta una differenza di potenziale generalmente di 100 volt; durante la corsa elettroforetica il gel viene controllato sotto una lampada ad emissione UV, in quanto l'interruzione del campo elettrico ed il suo reinstaurarsi non inficia la qualità della corsa stessa. Quando la banda di interesse risulta sufficientemente discriminata dagli eventuali contaminanti si procede alla rimozione fisica del frammento di gel contenente la banda di interesse, operazione effettuata tramite taglio con bisturi. E' buona norma cercare di mantenere il frammento di gel tagliato il più piccolo possibile per ridurre la perdita di campione. Il frammento così separato viene introdotto in un tubo da dialisi con un taglio di 12.000-14.000 dalton. Il tubo già chiuso ad una estremità viene riempito con un piccolo volume di TBE 1x e chiuso all'altra estremità. Il tubo viene inserito nella vaschetta elettroforetica contenente TBE 1x e posto in un campo elettrico la cui differenza di potenziale tra gli elettrodi risulti essere 100 volt. Dopo 15' il frammento di DNA si ritrova in soluzione ma catturato all'interno del tubo da dialisi; aperto il tubo, si può procedere al recupero del campione tramite pasteur o pipetta. Generalmente a questa procedura si fa seguire un'estrazione con un volume di una soluzione 1:1 v/v di fenolo-cloroformio ed una precipitazione con alcol-sali (0,3 M di Na-acetato pH 4,5; 2,5 volumi di etanolo). La soluzione viene mantenuta a -20°C per circa un'ora e centrifugata a 10.000 rpm per 10' in centrifuga eppendorf. Il DNA precipitato viene asciugato a temperatura ambiente e risospeso in pochi µl di acqua mQ o di tampone d'interesse.

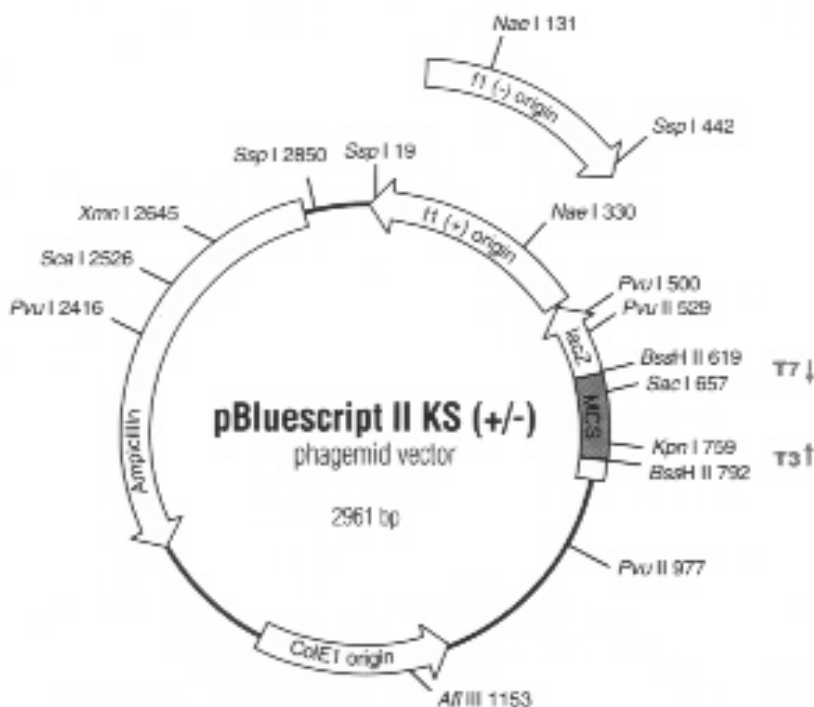
TBE 10x: 108 grammi di Tris, 55 grammi di acido borico, 40 ml di EDTA 0,5 M pH 8, portare ad un litro finale con acqua distillata

Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Il DNA è stato digerito con gli appropriati enzimi di restrizione nelle condizioni e con i tamponi salini consigliati dalle ditte fornitrici.

Ligasi di un frammento di DNA amplificato in Bluescript KS con coda di T

Il frammento di PCR precedentemente generato è stato purificato mediante estrazione fenolo cloroformio 1:1 v/v, successivamente precipitato con acetato di sodio a pH 4,5 ad una concentrazione finale di 0,3 moli e con 3 volumi di etanolo al 96% per un'ora a -80°C e successivamente centrifugato per 10' a 10.000 rpm in centrifuga eppendorf. Il plasmide Bluescript KS, precedentemente linearizzato nel sito Eco RV e trattato con TAQ polimerasi per la creazione di una coda di T ed il frammento di PCR sono stati ligati insieme utilizzando la ligasi del fago T4 nelle condizioni e col tampone salino consigliato dalla ditta fornitrice e controllato su gel di agarosio 1% in presenza di bromuro di etidio (0,5% $\mu\text{g/ml}$).



Tratto dal manuale del fornitore.

Creazione di stab di E. coli M15 competenti alla trasformazione

Per diminuire la possibilità di eterogeneità genetica dovuta a mutazioni casuali, cellule batteriche sono strisciate su piastre petri contenenti LB fatte solidificare grazie ad agar (concentrazione finale 1,5 % peso

volume) con ampicillina 50µg/ml finale. Lasciate crescere per tutta la notte, si sceglie una singola colonia da cui far partire la preparazione, appunto per garantire l'omogeneità genetica, o quanto meno per aumentarne la probabilità. La colonia selezionata viene trasportata in 5 ml di LB e fatta crescere a 37°C per tutta la notte. 0.5 ml della sospensione di crescita vengono diluiti in 50 ml di LB in una beuta da 250 ml per favorirne l'ossigenazione, fattore limitante la crescita batterica in liquido. I batteri sono fatti crescere a 37°C in agitazione sino al raggiungimento di 0.3 di densità ottica alla lunghezza d'onda di 580 Nm. Successivamente sono stati trasferiti 5 ml di questa coltura in una beuta da un litro contenente 100 ml di LB e fatti crescere alle stesse condizioni sino a quando l'assorbanza non avesse raggiunto il valore di 0.5 alla stessa lunghezza d'onda. Le cellule sono state poste in ghiaccio per 5' per bloccarne la crescita e trasferite in tubi falcon preraffreddati e centrifugate a 4000 rpm per 5' a 4°C per creare un sedimento batterico. I batteri sono stati risospesi in 30 ml totali di Tfb1 freddo, posti in ghiaccio per 90', centrifugati a 4000 rpm per 10' a 4°C, e risospesi molto delicatamente in Tfb2 freddo, 4 ml totale. La soluzione così ottenuta è stata divisa in aliquote di 200 µl in eppendorf sterili preraffreddati, eppendorf subito posti in ghiaccio secco e conservati a -80°C, per usi successivi.

TfbI 30 mM-K-acetato
100 mM rubidio-cloruro
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
aggiungere glicerolo (finale 15%)
portare a pH5,8 con 0,2 M di acido acetico
sterilizzare filtrando

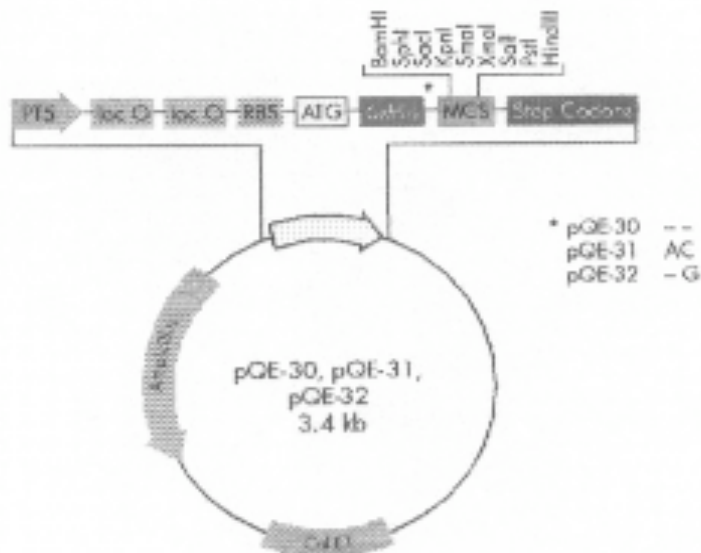
TfbII 10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM rubidio cloruro
aggiungere glicerolo (finale 15%)
portare a pH 6,5 con KOH
sterilizzare filtrando

Trasformazione di E. coli M15 ed XL1 Blue competenti con plasmide circolare covalentemente chiuso

Una aliquota di cellule competenti è stata posta per 20' in ghiaccio. E' stato aggiunto nell'eppendorf una piccola aliquota di plasmide (circa 20 Ng) e si è lasciato il tutto per altri 20' in ghiaccio. Successivamente vi sono due passaggi veloci di 2' a 37°C e 2' in ghiaccio, in quanto lo stress termico aiuta l'ingresso del plasmide all'interno delle cellule aumentandone di molto l'efficienza. Successivamente per aumentare la vitalità delle cellule così stressate vengono aggiunti 400 µl di LB senza antibiotico e si lasciano le cellule a crescere per 20' a 37°C. Le cellule così trasformate vengono strisciate su piastra petri con LB, agar ed antibiotico (come descritto nel paragrafo precedente) e lasciate crescere per tutta la notte.

Trasferimento di un frammento di DNA da Bluescript KS con coda di T al vettore di espressione pQE30

Sia il plasmide Bluescript KS contenente il frammento di interesse, sia il vettore pQE30 sono stati tagliati con gli enzimi di restrizione BamH1 e Sma I nelle condizioni e coi tamponi salini consigliati dalle ditte fornitrici. Il frammento ed il vettore pQE30 linearizzato sono stati controllati su gel di agarosio 1% in presenza di bromuro di etidio (0,5 µg/ml) in TBE 1x, elettroeluiti e ligati insieme con la ligasi di T4 alle condizioni e col tampone salino consigliato dalla ditta fornitrice.



Tratto dal manuale del fornitore.



Tratto dal manuale del fornitore.

Induzione di cloni di E. coli M15 trasformati con pQE30 contenente un inserto da esprimere

Batteri provenienti da singola colonia su piastra vengono fatti crescere per tutta la notte a 37°C in agitazione in una ampia beuta contenente LB addizionato di ampicillina 50µg/ml finale. L'indomani mattina si preleva una aliquota della crescita ormai giunta a saturazione, viene fatta una diluizione 1:40 in LB addizionato di ampicillina ed i batteri vengono fatti crescere per 60' in agitazione a 37°C in una ampia beuta. Successivamente si aggiunge IPTG alla soluzione, concentrazione finale 1mM. L'IPTG induce la sintesi del messaggero posto sotto il controllo dell'operatore O dell'operone lattosio, operatore che controlla la sintesi del messaggero la cui informazione risiede nel plasmide pQE30. Se il messaggero contiene una fase di lettura aperta, i batteri

iniziano a sintetizzare in modo massivo la proteina di interesse, dedicando buona parte del metabolismo cellulare appunto alla sintesi della proteina ricombinante. Da notare che l'IPTG non viene degradato dal catabolismo cellulare e rimane attivo per molto tempo, inoltre è in grado di indurre la sintesi della proteina in modo quantitativamente maggiore rispetto all'analogo fisiologico, quale il lattosio. Da notare che la crescita batterica dopo induzione con IPTG praticamente si arresta. Dopo induzione con IPTG i batteri vengono coltivati per 3 ore in agitazione a 37°C. Successivamente la sospensione di crescita viene centrifugata per 15' a 5000 rpm per far sedimentare i batteri.

Purificazione della proteina indotta

Il sedimento di batteri contiene al suo interno la proteina indotta con la coda di sei istidine covalentemente legata con un legame carbamidico. Per solubilizzare il contenuto delle cellule il sedimento viene risospeso nel "tampone d'inizio", circa 30 ml per 400 ml di sospensione di crescita batterica indotta. Utilizzando l'apparecchio Heat-System-Ultrasonic, Inc/W-385 si procede con 6 colpi da 30 secondi all'80% della potenza massima, intervallati da 30 secondi di pausa, per evitare un sovrariscaldamento del campione. Il tutto viene eseguito in ghiaccio. Successivamente il sonicato viene centrifugato in corex di vetro a 12.000 rpm per circa 40' per permettere la sedimentazione delle membrane e delle pareti batteriche. Il supernatante viene filtrato con un filtro di superficie il diametro dei pori del quale risulta essere uguale a circa 8 µm. La soluzione contenente il lisato viene fatta passare attraverso una colonna Hys-trap® seguendo le istruzioni del fornitore. Quando il lisato viene fatto passare attraverso la colonna, la proteina indotta, contenente le code di istidina, rimane ancorata alla resina. Vengono fatti passare molti volumi di colonna di "tampone d'inizio" per eluire le proteine rimaste ancorate in modo aspecifico alla colonna. Questo tampone contiene una bassissima concentrazione d'imidazolo che compete debolmente con le istidine per il legame al nichel.

Il profilo di eluizione è controllato durante tutto il processo tramite colorazione di Bradford in liquido, prelevando piccole aliquote del liquido passato attraverso la colonna. Quando l'eluato non dà più colorazione, si fanno passare dalla colonna una serie di volumi di soluzioni a crescente concentrazione d'imidazolo in grado di eluire la proteina, in grado di eliminare dapprima le proteine debolmente legate alla resina. Le frazioni sono raccolte in aliquote generalmente di 1 ml e

controllate su un gel di acrilammide al 16% in TBE-SDS con colorazione blu brillante Comassie. La velocità alla quale i liquidi si muovono all'interno della colonna è controllata tramite una pompa peristaltica posizionata generalmente su un flusso di 1 ml/minuto.

Tampone d'inizio fosfato buffer 1x

10mM imidazolo

Tampone d'eluizione fosfato buffer 1x

da 50 a 500 mM imidazolo

fosfato buffer 8x 14,2 grammi di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

11,1 grammi di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

233,8 grammi di NaCl

portare a pH 7,4

portare ad 1 litro di volume finale

sterilizzare filtrando con filtri col taglio da 0,45 μm

Hys-probe

Questo è un metodo principe nelle analisi di proteine ingegnerizzate contenenti una coda di istidine. Fatto correre in un gel di acrilammide al 16% le proteine di interesse, queste vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa tramite elettroblot (Millipore) seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. La membrana viene incubata per 1 ora circa con una soluzione di TBST addizionata di albumina sierica bovina 2,5mg/ml e lavata 3 volte per 5' con TBST in agitazione. Successivamente la membrana viene incubata per un'ora con la soluzione madre fornita dalla ditta diluita 1:10.000 in TBST per un'ora in agitazione. La membrana viene lavata per 3 volte per 5' in TBST in agitazione e successivamente la membrana viene analizzata per chemiluminescenza tramite Super Signal® seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. In pratica la soluzione madre contiene un'atomo di nichel legato covalentemente ad una perossidasi, la molecola così ottenuta risulta avere una affinità elevatissima per la coda di istidine, riuscendo ad evidenziare anche piccolissimi quantitativi di proteina ricombinando dando un segnale di fondo realmente trascurabile anche in condizioni non ottimali.

TBST 25 mM Tris pH 7,6

150 mM NaCl

Tween20 0,05% v/v

Analisi della proteina indotta tramite dot-blot

Le proteine di interesse, solitamente circa 1µg, vengono poste ad assorbire sulla superficie di una membrana di nitrocellulosa; una volta avvenuto l'assorbimento si incuba la membrana in agitazione con una soluzione di PBS 1x contenente 3% di albumina sierica bovina, 0,5% Tween20, 0,02% di NaN₃ per un'ora. La membrana viene lavata per 3 volte per 5' in agitazione con PBS 1x addizionato di Tween20 0,1% ed incubata per tutta la notte con singoli sieri o miscele di sieri di pazienti diluiti 1:5 con una soluzione PBS 1x finale addizionata di 0,25% di albumina sierica bovina, 0,1% Tween20, 0,02% NaN₃ in agitazione.

L'indomani la membrana viene lavata per tre volte per 5' con PBS 1x finale addizionato di Tween20 0.1% in agitazione ed incubata per un'ora con anti-IgE coniugate con perossidasi di rafano, diluita 1:10.000 in PBS 1x finale addizionato di 0,25% di albumina sierica bovina e 0,1% Tween20 in agitazione. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS 1x finale addizionato di Tween20 0,1% la membrana viene analizzata per chemiluminescente tramite Super Signal®, secondo le informazioni fornite dalla ditta fornitrice.

RISULTATI

Isolamento e sequenziamento.

Per l'isolamento di un nuovo allergene della *Parietaria judaica* è stata utilizzata una libreria di espressione in λ ZAPII, i cui RNA di partenza erano i polyA+ della infiorescenza della pianta stessa. Per analizzare la libreria è stata utilizzata una miscela di trenta sieri di pazienti fortemente allergici alla *Parietaria judaica* diluiti 1:5; questa miscela di sieri era stata preventivamente depauperata delle IgE specifiche contro Par j 1 e contro Par j 2 legando questi ultimi come allergeni ricombinanti ad una colonna CNBr e facendo passare la miscela attraverso essa (inoltre i sieri sono stati incubati con un grande eccesso delle due proteine ricombinanti). Sono state così analizzate circa 6×10^5 placche di lisi per controllarne l'eventuale legame con le IgE rimaste nei sieri, utilizzando anti IgE di capra coniugate con perossidasi di rafano (Biosource International) ed il sistema di rivelamento chemiluminescente Super Signal (PIERCE, USA). Le placche che diedero segnali positivi furono successivamente analizzate per verificare che non fossero placche contenenti l'informazione codificante per Par j 1 o per Par j 2; a tal scopo sono state utilizzate sonde radioattive di DNA codificante per i due allergeni maggiori marcate col metodo degli inneschi casuali con P^{32} , come descritto in "materiali e metodi". Le placche risultanti positive all'analisi con le IgE e negative all'analisi con le sonde di DNA (quindici in tutto) sono state quelle su cui si è continuata l'analisi, vista l'elevata probabilità che contenessero al loro interno le informazioni per un nuovo allergene della *Parietaria judaica*, speranza fortunatamente non risultata vana. Tali placche sono state sequenziate con il metodo di Sanger, mostrando di contenere un solo clone con un inserto di 391 paia di basi con una coda di poly-A canonica. Una seconda analisi della libreria di espressione, eseguita utilizzando una sonda marcata con P^{32} che copriva l'intera regione codificante del clone isolato, non ha portato all'isolamento di cloni a lunghezza maggiore.

L'informazione ottenuta dal sequenziamento è stata utilizzata per effettuare un'analisi definita RACE (rapid amplification cDNA ends, amplificazione rapida delle estremità di cDNA) che permette di isolare mRNA a lunghezza completa voluti da estratti totali di RNA, ma che necessita di avere almeno porzioni di sequenza nota.

```

1                                     54
gaaaacaaagtcatatcatttgcttagacaccaacaaaccaacaaagtaataa
55      Par30 → 111
ATGGAGAGCGCCAAGGAGATGAGCCACCACGCCGGAGAGGCCAAGGGCCAAGCTCAG
112      ← Par31 169
GAGAAGACTAGCACTATCATGGACCATGCAAGCAACACTGTCCAATCTGCCAAGGAG
170      ← Par32 227
TCAATTCAAGAGGTCGGGACTCAGGCCAGTGCCAAGGCTCAGGGAGCCGTTGAGGCT
228 285
GCGAAGAACGCAACCGGCATGAACAAATAAAAGCTTGAATTTCCGAGGAGATGTTTG
286 343
AAATAAAAAATGGAAGCTTTTCTTTCAGGGCTTTTCTTTGTCCTTGACTTGTTTGCT
344 401
TCTTATTAGTTTTTTTTTTGGTTGTCTCATTGACTAAGAACAAAGAGTTCTTTGTG
402 459
TTGGAGTTTGAATTATGATAATAGCTTCTTTGTAATAAACATGTCCTCGATTGCAA
460 484
ATAAATAGTCTCTTACTGATATTCTaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Race.

Gli mRNA totali di infiorescenza di *Parietaria judaica* sono stati trattati secondo il protocollo RACE per ottenere tutti i messaggeri a lunghezza completa polyA+. L'amplificazione specifica del RACE è stata condotta utilizzando l'innesco GeneRacerTm 5'(5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA3') e l'oligo specifico Par j 32 (5'CTTGGCACTGGCCTGAGTCCC3') utilizzando la PCR alle condizioni di 30 cicli di 94°C 1', 60°C 1', 72 °C 1'. Successivamente, una aliquota dell'amplificato (1 µl di una diluizione 1:100) è stato nuovamente amplificato alle stesse condizioni utilizzando gli inneschi GeneRacerTm 5' interno (5'GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA3') e lo specifico Par j 31 (5'ATGGTCCATGATAGTCGTAGT3'). Consiglio di analizzare la figura per capire appieno il posizionamento degli oligo e la qualità dell'amplificato finale.

Quest'ultimo amplificato è stato analizzato su gel di agarosio all'1,5% e la banda di interesse elettroeluita, clonata all'interno del vettore Bluescript KS con coda di T, e l'inserto è stato sequenziato secondo il metodo di Sanger. Ricordo che il vettore utilizzato ha una efficienza elevatissima, in quanto è in grado di richiudersi solo ed esclusivamente con l'inserto amplificato da PCR che presenta la coda di A specifica per la coda di T presente agli estremi del vettore.

L'utilizzo della metodica Race ha permesso di isolare il messaggero a lunghezza completa che presenta 114 basi aggiuntive al 5'. Il

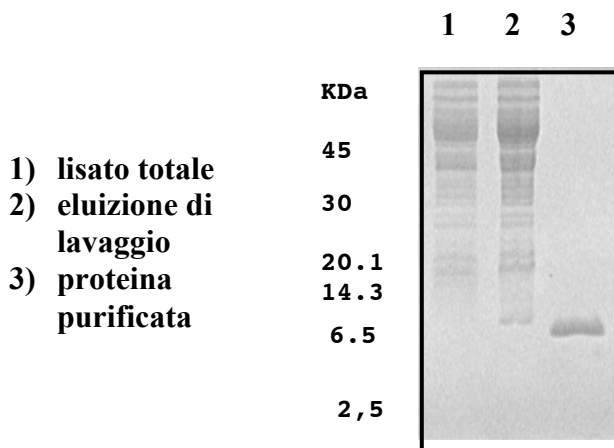
metionina d'inizio sino a dopo il polyA+. Le condizioni di amplificazioni sono le stesse descritte poco sopra.

Espressione, purificazione e caratterizzazione immunologica della proteina ricombinante.

Il frammento ed il vettore di espressione pQE30 sono stati tagliati con BamH1 e Sma I e ligati insieme. Il sito Sma I cade a valle della regione codificante. Il vettore pQE30 è stato scelto perché consente di mantenere la corretta fase di lettura anche con l'aggiunta della coda di istidine; questo vettore fa parte di una famiglia di tre vettori, gli altri due sono detti pQE31 e pQE32, famiglia che permette di avere in ogni caso un vettore che consenta il mantenimento della fase di lettura aperta. I cloni ricombinanti sono stati nuovamente sequenziati ed in tal modo è stata confermata sia la fase di lettura aperta, sia la assenza di errori sperimentali.

Il vettore è stato inserito in un ceppo di E. coli M15, la proteina è stata fatta esprimere e si è proceduto successivamente alla purificazione per la caratterizzazione immunologica tramite dot blot. Sono stati utilizzati 18 sieri di pazienti allergici alla *Parietaria judaica* e tre sieri di pazienti non allergici come controlli negativi; i risultati rivelano che nessuno dei controlli negativi ha IgE specifiche contro la proteina ricombinante, mentre il 50% dei sieri allergici analizzati mostra una più o meno marcata risposta all'allergene; tutto ciò porta fortemente a pensare che sebbene Par j 3 non possa essere considerato del tutto un allergene maggiore, una alta percentuale dei soggetti ipersensibili al polline di questa

pianta debbano le loro reazioni anomale al contatto di questa molecola colle loro vie aeree.



DISCUSSIONE

Metodologie terapeutiche.

Nella cura delle allergie vi sono due strategie principali seguite: la prima è la somministrazione di farmaci che curano la sintomatologia, la seconda sono strategie che cercano di curare l'allergia modificandone i meccanismi alla base. Le cure sintomatologiche si basano sulla somministrazione di antistaminici per bloccare il recettore H1 per l'istamina, adrenalina per contrastare l'ipotensione provocata in seguito ad anafilassi, agonisti β_2 adrenergici miorilassanti bronchiali, antileucotrieni, inibitori della nitrossido sintetasi, corticosteroidi che inibiscono la sintesi dei messaggeri di prodotti proinfiammatori, somministrazione di spettri di citochine che deviano il fenotipo verso Th1. Viste nello specifico, iniezioni di adrenalina sono utilizzate in ambito clinico per curare crisi anafilattiche, ma la riuscita non è mai certa, non sempre il paziente riesce a salvarsi. La cura sintomatologica più efficace è probabilmente l'uso di inalare sostanze β_2 -adrenergiche per combattere i sintomi di una crisi asmatica: permettono il rilassamento della muscolatura dell'apparato respiratorio molto velocemente, facendo aumentare la concentrazione di cAMP ed aprendo quindi i canali del potassio; molto probabilmente sarà impossibile trovare altri farmaci migliori di questi per curare questo tipo di sintomatologia. La capacità antiinfiammatoria dei corticosteroidi è largamente conosciuta, purtroppo, visto che la loro azione è nucleare, in quanto i loro recettori attivati funzionano da fattori di trascrizione, gli effetti collaterali ed eventualmente secondari sono di grande rilievo, in quanto i corticosteroidi provocano modificazioni su larga scala all'interno dell'organismo, tra queste modificazioni v'è pure un marcato effetto antinfiammatorio. Farmaci corticosteroidi di nuova generazione hanno effetti collaterali ridotti ed una buona clearance epatica. Si stanno studiando molecole che sebbene efficaci a livello dei polmoni, vengano degradate nel plasma sanguigno. La somministrazione di sostanze anti interleuchina 4, anti interleuchina 5, anti interleuchina 13, anti TNF hanno dato sperimentalmente risultati incoraggianti. Si stanno cercando farmaci che promuovano il rilascio di interleuchina 10 antiinfiammatoria; purtroppo sovrapproduzione di interferone γ , e di interleuchina 12, sebbene potrebbero avere effetti positivi sulla patologia, presentano troppi effetti collaterali se non prodotti in situ in condizioni opportune, difficili da mimare in ambito clinico ed ancor di meno in ambito farmacologico.

Un'altra serie di studi ha cercato di trovare farmaci attivi a livello citosolico o nucleare, ma la difficoltà dell'indirizzamento e della specificità del trattamento rappresentano ancora ostacoli da superare, con problematiche simili a quelle riscontrate nell'uso dei corticosteroidi.

Le cure che permettono la scomparsa permanente del fenotipo allergico sono la somministrazione di spettri di citochine che deviano permanentemente il fenotipo verso Th1 (in fase sperimentale), o l'antica e sempre efficace ITS (immuno terapia specifica); applicazioni della terapia ITS sfruttano la possibilità di modificare le molecole iniettate per ottenerne di nuove che meglio si prestino a spostare l'assetto citochinico verso Th1; studi di questo tipo sono in corso nel laboratorio in cui ho prestato servizio come tesista, con risultati incoraggianti. Un'altra strategia cerca di utilizzare peptidi che contengano singoli epitopi, in modo da saturare gli anticorpi caricati sui mastociti ed impedire la formazione del ponte tra i recettori, ponte che per la sua formazione richiede la presenza di molecole che abbiano almeno due epitopi in esse.

Vista l'importanza della prevenzione delle allergie in soggetti giovani, constatata la difficoltà di far revertire soggetti con risposta anomale verso risposte tradizionali, l'ipotesi di utilizzare pseudovaccini per impedire l'evolversi del fenotipo allergico risulta come una proposta di non poco interesse. I neonati sono fortemente focalizzati verso Th2 come conseguenza dei meccanismi di prevenzione del rigetto del feto da parte della madre; il loro cambiamento verso Th1 è da imputarsi ad agenti Th1 inducenti che se mancanti nell'ambiente possono portare al perdurare del fenotipo Th2 e quindi predisporre all'insorgere delle allergie. Tra le tante sostanze candidate un'ottima risposta sperimentale è venuta da oligo CpG demetilati, tipiche sequenze contenute nel DNA batterico fortemente Th1 inducenti, che sebbene presentino effetti collaterali non del tutto trascurabili, sono oggetto di studi volti appunto al fine di eliminare o quantomeno contenere questi effetti indesiderati per ottimizzare questa metodologia terapeutica [19].

ITS.

Per le conoscenze attuali, la terapia curativa più efficace rimane indubbiamente la ITS; cercherò di analizzare i meccanismi molecolari che stanno alla base di questa metodologia, ricordando però che spesso sono solo ipotesi o dati incompleti, in quanto l'unica cosa certa è che

per molti pazienti funziona, ma le basi molecolari sono capite purtroppo solo in parte.

Da un punto di vista clinico, la ITS si attua somministrando al paziente dosi crescenti di allergene per via sottocutanea. Dopo un periodo di trattamento il fenotipo allergico spesso regredisce, probabilmente per cambiamento isotipico delle cellule T da Th2 a Th1. Generalmente nella ITS gli allergeni vengono somministrati insieme a sostanze che si è visto tendono ad indurre il fenotipo Th1. Il rischio della ITS consiste nella problematica che le molecole curative sono le stesse che possono provocare la risposta allergica, colla possibilità che se gli allergeni entrano nel circolo sanguigno si possa manifestare una risposta anafilattica.

A basse concentrazioni di antigene (come avviene nel caso di allergie da polline inalato) sono generalmente le cellule B sensibili attivate a fungere da APC tramite l'internalizzazione IgE-mediata; queste interagendo con cellule Th2 le inducono a secernere la loro gamma di citochine Th2 stimolanti ed IgE stimolanti, tendendo in un ciclo automantenentesi ad aumentare la risposta allergica.

Ad alte concentrazioni di antigene (come avviene nel caso della ITS) vengono attivate anche le APC non specifiche, come macrofagi, cellule dendritiche e cellule B generiche, che spostando il rapporto interleuchina4/interleuchina 12 a favore di quest'ultima, tendono a focalizzare l'ambiente verso Th1. Ordunque, in questo ambiente le cellule Th0 molto probabilmente evolveranno verso Th1 piuttosto che verso Th2, revertendo il fenotipo allergico verso il fenotipo normale. Ricordo che è molto più semplice spostare cellule T vergini verso Th1 piuttosto che ridirigere cellule Th2 verso Th1. Un aumentato livello di interleuchina 12 fa aumentare la concentrazione di interferone γ e porta ad una diminuzione di interleuchina 4, 5 e 13, diminuendo la capacità chemiotattica nei confronti degli eosinofili che tendono a non migrare più nel sito di infiammazione, o, nel caso della ITS, nel sito dove è presente l'allergene, impedendo o limitando le reazioni di fase tardiva. Si è notato che quando il TCR è debolmente stimolato dal peptide presentato dalle APC le cellule T tendono ad evolversi verso Th2, quando invece sono stimulate fortemente e per lungo periodo vanno incontro ad anergia, si dedifferenziano in Th0, non proliferano più ed iniziano a secernere interleuchina 10, antiinfiammatoria, stimolando le cellule vicine a fare altrettanto. Molto probabilmente durante la ITS vengono raccolte in situ molte cellule allergene-specifiche che vanno incontro a modificazioni mediate dall'ambiente citochinico particolare

in cui si vengono a trovare che tende a spostare il fenotipo di tutte le cellule interessate verso una risposta Th1 invece che Th2. Inoltre l'interleuchina 10 spinge le cellule in un ambiente Th2 a produrre IgG4 protettive invece che IgE proinfiammatorie. Si è visto che dopo un trattamento ITS il rapporto IgG4/IgE specifiche è di molto aumentato, sebbene il valore assoluto delle IgE sia rimasto pressoché costante durante tutto il trattamento, in quanto le cellule memoria rimangono vive ed attive nell'organismo. Si è visto sperimentalmente che cellule T in stato di anergia indotto da interleuchina 10 tornano attive se stimolate con interleuchina 2; se queste cellule neoattivate vengono costimate con interferone γ divengono Th1, con interleuchina 4 invece Th2 [19] [25].

La terapia ITS crea un particolare microambiente sottocutaneo nel quale ridirige il delicato concerto umorale e cellulare, reindirizzando le cellule richiamate in situ verso una risposta immunitaria tipica e non anomala, ma la ITS spesso gioca in mezzo a lame e fuochi, in quanto la variabilità individuale è elevatissima ed ha un ruolo non indifferente nella riuscita della terapia; da ciò l'importanza di eliminare il più possibile altri fattori di variabilità, come la composizione del composto iniettato. Come spiegherò meglio successivamente la metodologia degli allergeni ricombinanti permette di avere una titolazione certa delle molecole iniettate, perfezione inottenibile da metodi di purificazione tradizionali a partire dai composti che si trovano in natura. Ricordo infine che il bilancio Th1/Th2 in un organismo non è qualcosa di fisso e determinato ma, come quasi tutto nel mondo biologico, ed è questa forse la meraviglia degli esseri viventi, tutto risulta sempre messo in gioco e suscettibile di modificazioni anche profonde. Ogni qualvolta noi ricercatori studiamo e proponiamo qualcosa che debba andare ad interagire con questo concerto cantato da milioni di voci soliste, dobbiamo ricordare che stiamo interagendo con le corde di un tessuto complesso, grande e dedalico, dal livello molecolare a quello ecologico, anch'essi intessuti insieme attraverso gli organismi nella loro interezza, e non debbo ricordare i danni macroscopici che noi esseri umani siamo stati in grado di infliggere al pianeta nostra madre. L'esplosione delle allergie (ricordo che un bambino su quattro nei paesi "civilizzati" soffre di asma, e le allergie sono una delle cause principali di questa sintomatologia) è solo un altro triste esempio di come noi esseri umani ci siamo allontanati dai percorsi corretti, e spero che potremo dare con questi studi un mondo migliore ai nostri figli dove vivere, dove almeno possano nascere non malati. Un proverbio dei nativi americani dice

“non ereditiamo la Terra dai nostri padri, la prendiamo in prestito dai nostri figli” .

Vantaggi nell'uso di allergeni ricombinanti.

Generalmente le molecole utilizzate durante una ITS sono estratte da composti totali della pianta o dell'agente contenente gli allergeni, purificati con metodi di biochimica classica. Questa procedura presenta una serie di grossi svantaggi; spesso i quantitativi di sostanza ottenuta sono bassi, inoltre alcune procedure possono portare alla degradazione od alla perdita di configurazione tridimensionale delle molecole di interesse. Ancora, spesso gli allergeni sono di origine proteica e spesso sono presenti molte isoforme della stessa proteina, con caratteristiche leggermente diverse. Inoltre ancora se il composto di partenza è eterogeneo, come il polline, si deve considerare che il materiale su cui si lavora proviene da molte piante differenti, ognuna con la propria storia, la propria genetica, le proprie condizioni contingenti in cui è avvenuta la raccolta. Infine ancora le possibilità di contaminazione, anche ad opera di xenopollini, sono elevate. La tecnologia del DNA ricombinante risolve tutte queste problematiche, in quanto le proteine di interesse possono essere prodotte in quantitativi teoricamente illimitati; stabili di batteri o lieviti contenenti l'informazione possono essere facilmente trasportati in tutto il mondo, molto più facilmente rispetto al trasporto delle proteine in quanto tali. Si può scegliere quale singola isoforma presenti le caratteristiche migliori per gli scopi preposti, e produrre solo quella o solo quelle di interesse. La genetica della proteina prodotta è controllata e facilmente controllabile, ed è prodotta da cloni geneticamente identici, non da molte piante differenti. Il prodotto ottenuto non può essere contaminato da altri pollini ed è facilmente purificabile in un breve periodo di tempo. Le proteine ricombinanti possono essere prodotte tutto l'anno senza dover ricorrere a coltivazioni in serre controllate. In breve le proteine prodotte con questa metodologia sono quasi pure, la loro composizione è certa, sono facilmente producibili, non limitate nella loro produzione né dal tempo né nella quantità: vengono eliminati moltissimi fattori di variabilità che possono essere potenzialmente pericolosi se si considera che lo scopo ultimo di queste molecole è la loro iniezione in dei pazienti umani.

Un'ulteriore nota, la possibilità di avere allergeni puri apre la possibilità alla caratterizzazione certa di tutto lo spettro allergico del paziente, potendo ipotizzare che in un futuro non troppo lontano i pazienti allergici possano essere curati per la loro allergia alla singola molecola,

od alla singola isoforma della molecola, e non per la loro allergia al polline della pianta, impedendo che possano venire sensibilizzati a nuovi allergeni presenti nel polline stesso. Non mi sembra impossibile che in un futuro verranno realizzate delle microtavole preconfezionate, come ne esistono oggi per alcuni esami biomolecolari su polimorfismi del DNA, dove verranno saggiati i sieri di pazienti allergici contro migliaia di molecole potenzialmente allergiche per avere uno quadro esatto delle molecole riconosciute dalle sue IgE, ed eventualmente in base a questo fare l'esame di reazione cutanea, il più sensibile esistente che analizza in vivo e non in vitro l'effettiva reazione allergica del paziente, questa ad oggi presenta una grossa limitazione: viene fatto su porzioni di pelle scarificata del paziente, e per ciò non è possibile saggiare migliaia di singole molecole, a meno che non si voglia torturare il paziente ad essere scorticato vivo per curare una congiuntivite allergica. In quest'ottica a lungo tempo, i test ospedalieri allergici si effettuerebbero in due tempi, a costo molto basso e con una caratterizzazione del quadro allergico del paziente esatto alla singola molecola, con uno stress molto ridotto per il paziente ed applicabile su un largo numero di individui. Riuscire ad ottenere analisi così standardizzate permetterebbero anche di poter fare valutazioni statistiche su larga scala in modo molto semplice e quasi automatizzato, avendo come materiale di partenza solo un prelievo di sangue dei pazienti da saggiare.

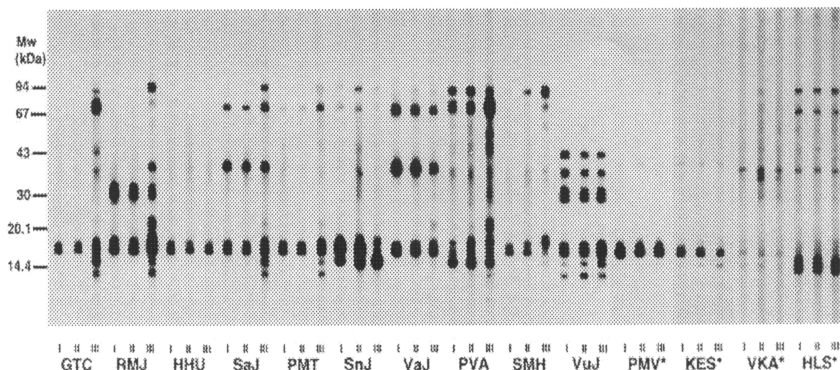
Un ultimo vantaggio delle proteine ricombinanti è la possibilità di modificarne la struttura in modo preciso e controllato, o per la creazione di ipoallergeni, o per la creazione di peptidi dalla composizione certa. Qualunque modificazione molecolare si voglia attuare a carico della molecola di interesse, se portata avanti in vettori biologici, risulta essere di facile realizzazione e facilmente riproducibile, se confrontata con qualunque mezzo fisico-chimico si voglia utilizzare in alternativa.

Tutto ciò risulta impensabile se si esclude la possibilità di utilizzare la tecnologia del DNA ricombinante.

L'aspetto che maggiormente frena l'utilizzo delle molecole ricombinanti è il costo necessario alla produzione di queste, di molto più elevato rispetto a delle coltivazioni in terra ed a delle procedure di purificazione tradizionali, in quanto richiedono macchinari più sofisticati e personale specializzato. Credo di poter affermare che il bilancio tra i vantaggi su esposti ed il peso economico della produzione suggerisca fortemente che, se l'obiettivo è il benessere dell'uomo,

l'utilizzo di molecole ricombinanti rispetto a quelle native sia una scelta civile e doverosa, ricordando che se le produzioni divengono massive i costi ovviamente si abbassano fortemente, mitigando l'unico aspetto negativo nell'uso di queste molecole [18].

Per ribadire l'importanza della caratterizzazione minuta delle molecole allergoferenti presenti in un composto misto, oltre alle osservazioni fornite in precedenza, porto qui un dato ricavato da Movèrre et al. su uno studio condotto su pazienti allergici alla betulla sottoposti ad ITS con estratto di polline, studio protrattosi nel corso di più anni.



Le colonne sono organizzate a gruppi di tre. Ogni gruppo rappresenta l'evoluzione temporale di un singolo paziente nei confronti dell'estratto totale di betulla durante una terapia ITS protrattasi per anni. Come si evince facilmente, i pazienti iniziano a riconoscere altre proteine della betulla rispetto a quelle iniziali, probabilmente sensibilizzati durante la terapia ITS effettuata con estratto totale e non con singole proteine purificate. Tratto da [27].

Come si può facilmente evincere dallo studio della figura allegata, molti pazienti iniziano a mostrare una produzione di IgE specifiche per altri allergeni presenti nel polline a cui originariamente risultavano negativi, sensibilizzazione probabilmente provocata dal contatto prolungato del loro sistema immunitario con gli altri allergeni presenti nel polline utilizzati nella terapia ITS tradizionale [27]. Alla luce delle conoscenze attuali, l'unica terapia realmente efficace contro le reazioni allergiche risulta la ITS, e l'unico modo per impedire che pazienti divengano sensibilizzati a nuove molecole copresenti all'interno delle soluzioni iniettate è l'utilizzo di molecole ricombinanti, che permettono dapprima la caratterizzazione certa del profilo allergologico del paziente e successivamente la somministrazione certa delle molecole allergoferenti, sia quantitativamente che qualitativamente. Sebbene l'uso di molecole ricombinanti faccia innalzare il costo della terapia, il

probabile miglioramento dello stile di vita del paziente associato ad una terapia con minori effetti collaterali e più scientificamente standardizzabile dovrebbe persuadere anche la più scettica delle menti dell'enorme vantaggio nell'uso delle molecole ricombinanti, sempre che l'obiettivo ultimo sia il benessere dell'uomo malato e non l'arricchimento dell'uomo che cura.

Guardando dal punto di vista né del medico, né del paziente, né delle case farmaceutiche, ma solo dal punto di vista del ricercatore, l'isolamento e la caratterizzazione di più molecole allergeniche possibili potrebbe portare alla luce della conoscenza i fattori che rendono una molecola allergenica e non solo immunogena. Ai nostri giorni esistono solo indicazioni che sono forti più di caratteristiche fisico-chimiche che biochimiche propriamente dette, quali le piccole dimensioni e la stabilità delle molecole. Potere raggruppare in banche dati molte caratterizzazioni minute di molecole allergeniche potrebbe portare alla creazione di famiglie di molecole che posseggono una qualche caratteristica che le rende potenzialmente allergeniche. Queste caratteristiche sono manipolabili od analizzabili per la creazione di nuove molecole o di nuove terapie contro questo male in diffusione nel mondo occidentale ormai perso per strade lontane dai percorsi datici dalla Madre Terra, visto che l'uomo, soprattutto nel corso dell'ultimo secolo, non ha seguito la via della cooperazione e dell'integrazione col corso della Natura ma la via della reggenza su Essa. Noi uomini abbiamo le mani sporche di sangue e di petrolio, ed abbiamo l'onere e l'onore di poter riparare ciò che si può ancora riparare, preservare ciò che deve essere preservato, e migliorare la vita nostra e di nostra Madre. I nativi americani pensano che la missione dell'uomo sia quella di custodire il pianeta e tutto ciò che esso contiene; noi uomini e soprattutto noi uomini di scienza abbiamo il potere sia di preservare che di distruggere, e spesso, troppo spesso, la linea che divide questi due atteggiamenti diviene confusa, ed in buona fede od in mala fede viene superata, preferendo il benessere dell'uomo o del singolo stesso per denaro o potere rispetto all'armonia di cui dovremmo essere custodi e garanti nei confronti del mondo e nei confronti dei nostri figli.

Spero che lo studio da me condotto potrà aiutare le generazioni successive a migliorare le proprie condizioni di vita senza danneggiare l'ambiente in cui dovranno vivere; la caratterizzazione di un singolo allergene di una singola pianta può far parte di una costruzione molto più complessa, nel quale anche un singolo piccolo mattone può contribuire alla struttura di ciò che noi uomini stiamo costruendo

attraverso l'evolversi della nostra razza ed all'ampliarsi della nostra conoscenza.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Raffaelli M. (1977) *Webbia* 31, 49-68.
- [2] Roitt I. et al. (1998) *Immunology* V ed., Mosby.
- [3] Romagnani S. (1998) *Allergy* 53 sup. 46, 12-15.
- [4] Corry D. et Kheradmand F. (1999) *Nature* 402 sup., 18-23.
- [5] Cookson W. (1999) *Nature* 402 sup., 5-11.
- [6] Holgate et al. (1998) *Allergy* II ed., Mosby.
- [7] von Mutius E. (2000) *Allergy clinic immunology* 105, 9-19.
- [8] Holt P. Et al.(1999) *Nature* 402 sup., 12-17.
- [9] Menegozzo M. et al. (1976) *Immunochemistry* 13, 475-476.
- [10] Geraci D. et al. (1978) *Immunochemistry* 15, 491-498.
- [11] Corbi A. L. et al. (1986) *Molecular immunology* 23, 1357-1363.
- [12] Geraci D. et al. (1985) *Int Arch Allergy Appl immunology* 78, 421-428.
- [13] Corbi A.L. et al. (1984) *Int Arch Allergy Appl immunology* 74, 318-323.
- [14] Ford S.A. et al. (1986) *Int Arch Allergy Appl immunology* 79, 120-126.
- [15] Corbi A. L. et al. (1985) *Molecular immunology* 22, 1081-1089.
- [16] Colombo P. et al. (1998) *Allergy* 53, 917-921.
- [17] Costa M.A. et al (2000) *Allergy* 55, 246-250.
- [18] Chapman M. D. (2000) *J Allergy Clin Immunology* 106/3, 409-418.
- [19] Barnes P. J. (1999) *Nature* 402 sup., 31-38.
- [20] Ayuso R. et al. (1988) *Molecular immunology* 25, 49-56.
- [21] Cocchiara R. et al. (1989) *Int Arch Allergy Appl immunology* 90, 84-90.
- [22] Costa M. A. et al. (1994) *FEBS Lett* 341, 182-186.
- [23] Duro G. Et al. (1996) *FEBS Lett* 399, 295-298.
- [24] Colombo P. et al. (1998) *Journal immunology* 160, 2780-2785.
- [25] Rolland J. et al. (1998) *Curr Opin Immunology* 10, 640-645.
- [26] Durham S. et al (1999) *N Eng J Med* 341/7, 468-475.
- [27] Movèrere R. et al. (2002) *Allergy* 57, 423-430.

